

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDA PASQUALIM

NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO IDEBENONA A PARTIR
DA ALQUILAÇÃO DA GALACTOMANANA

CURITIBA

2020

FERNANDA PASQUALIM

NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO IDEBENONA A PARTIR
DA ALQUILAÇÃO DA GALACTOMANANA

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Farmácia, no Curso de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de
Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas

CURITIBA

2020

Pasqualim, Fernanda

Nanopartículas poliméricas contendo Idebenona a partir da alquilação da galactomanana [recurso eletrônico] / Fernanda Pasqualim – Curitiba, 2020.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2020.

Orientador: Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas

1. Aminoação Redutiva. 2. Idebenona. 3. Galactomanana. I. Freitas, Rilton Alves de. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 547.2



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS - 40001016042P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **FERNANDA PASQUALIM** intitulada: **Nanopartículas poliméricas contendo Idebenona a partir da alquilação da galactomanana**, sob orientação do Prof. Dr. **RILTON ALVES DE FREITAS**, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 30 de Abril de 2020.

Assinatura Eletrônica

01/06/2020 16:38:01.0

RILTON ALVES DE FREITAS

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

28/05/2020 16:20:41.0

TANIA MARI BELLE BRESOLIN

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ)

Assinatura Eletrônica

30/05/2020 12:15:23.0

FRANCINE VALENGA

Avaliador Externo (PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ)

À minha família e amigos que tanto
me apoiaram nesta empreitada, dedico
este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as coisas que criou e por todas as pessoas boas que colocou em meu caminho.

A meus pais, por todo o apoio que me deram nesta etapa da minha vida e pela compreensão nos dias mais difíceis.

À minha irmã, cunhado e sobrinha, por ajudarem a alegrar meus dias tornando-os mais leves e pelo apoio.

À mãe UFPR, motivo de muito orgulho para todos seus graduados.

Ao Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas por me aceitar como orientanda, mesmo sem me conhecer direito. Pela sua paciência e dedicação. Foi uma honra ter sido sua aluna neste período. Sua competência e conceito nos elevam como grupo de pesquisa.

Aos membros da Banca Prof.^a. Dr.^a. Tania Mari Bellé Bresolin da UNIVALI e Prof.^a. Dr.^a. Francine Valenga da PUC, pelo tempo despendido na avaliação deste documento e pelas orientações dadas, que sei que serão de grande valia.

À Prof.^a. Dr.^a. Tomoe Nakashima, pelo apoio durante minha caminhada na UFPR.

Às alunas de doutorado Joslaine Jacumazo, Gabriela Parchen e à aluna de mestrado Bianca Hazt pelas risadas compartilhadas e por serem sempre um ombro amigo nos momentos de nervosismo.

À aluna de voluntariado acadêmico Isabella Peres pela ajuda nos experimentos e pela companhia no laboratório.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação da Farmácia, pela ajuda nos experimentos, empréstimo de reagentes, e compartilhamento de conhecimento e experiências.

Ao laboratório BioPol Prof.^a M.^a Rita Sierakowski por ceder o espaço para a realização dos experimentos e aos colegas de grupo pelo auxílio na realização e interpretação dos experimentos.

À Central Analítica do Departamento de Farmácia e à Gracinha pelo uso do liofilizador e pela solicitude em conceder o uso dos equipamentos.

Ao Centro de Estudos em Biofarmácia (CEB) e ao Prof. Dr. Roberto Pontarolo, por possibilitar o uso do CLAE, do FTIR e do MS e pelo empréstimo de reagentes.

Aos alunos do CEB, sempre tão solícitos em ajudar-nos; em especial aos alunos Eric, Alexandre, Victor, Allan, Raquel, Breno, Danilo e Juliana.

Ao Laboratório de Ecologia Química e Síntese de Produtos Naturais (LECOSIN) e ao Prof. Dr. Francisco de Assis Marques, por possibilitar o uso do rotaevaporador e pelo empréstimo de reagentes.

Ao Laboratório de Oxidações, por possibilitar o uso do fluorímetro e ao Departamento de Química da UFPR, pela utilização do espectrofotômetro de UV.

Ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (LabRMN) e seus técnicos, pela realização das análises de RMN e à Dr^a. Mariana Mazetto pelo auxílio na preparação das amostras e interpretação dos dados de RMN.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica (CME-UFPR) e a seus técnicos pelo auxílio no preparo de amostra e aquisição das imagens por microscopia eletrônica.

À CAPES, pelo apoio financeiro e incentivo a pesquisa.

Você não sorri porque coisas boas
acontecem, coisas boas acontecem porque
você sorri.

(A autora)

RESUMO

A Idebenona é antioxidante análogo da coenzima Q10 (Ubiquinona), presente na cadeia de transporte de elétrons. Um grande desafio que se encontra no uso de tal fármaco é a sua baixa estabilidade em condições de prateleira, além de alta hidrofobicidade e potencial irritante. Assim, propõe-se o seu encapsulamento, a fim de facilitar sua aplicação e armazenamento. Para tal, sugeriu-se a criação de um sistema polimérico capaz de criar ambientes hidrofóbicos com os quais a idebenona possa interagir. Para a confecção deste sistema, optou-se pelo polímero natural goma guar, devido a seu baixo custo e facilidade de obtenção. Após a purificação, a modificação foi iniciada com a oxidação da goma com o reagente sistema TEMPO/NaClO em pH 9,3, a 3 °C com purga de N₂; e posterior alquilação utilizando dodecilamina e cianoborohidreto de sódio em pH 5,0 a 25 °C. As reações foram otimizadas a fim de se determinar a melhor condição oxidativa para a geração de aldeídos que reajam pela via de aminação redutiva com a dodecilamina. Após a alquilação da galactomanana espera-se que as cadeias carbônicas da dodecilamina interajam entre si criando uma espécie de micela polimérica capaz de encapsular a idebenona. Após tal reação, a galactomanana oxidada (OX) e alquilada (ALQ) foram caracterizadas por FTIR e RMN, respectivamente, onde confirmou-se a ocorrência de reação pelo aumento da intensidade da banda a 1730cm⁻¹ por FTIR e deslocamento do assinalamento do H-6 da manose livre por RMN. A capacidade surfactante da galactomanana alquilada foi comprovada por tensiometria, onde observou-se declínio da tensão superficial da solução a 1 mg mL⁻¹ de aproximadamente 30 mN.m⁻¹ quando comparada à água pura. Utilizou-se também uma sonda fluorescente de pireno na determinação do ponto de saturação do polímero de ALQ, ou seja, a concentração mínima necessária para que a galactomanana formasse partículas auto associadas, sendo determinada tal concentração em aproximadamente 0,5 mg.ml⁻¹. Diferentes técnicas de encapsulação também foram testadas, bem como o tempo de sonicação das partículas e a proporção de fármaco:polímero a fim de se alcançar a maior encapsulação possível. Assim, para o encapsulamento da idebenona foram utilizadas soluções a 1 mg mL⁻¹ de galactomanana alquilada com proporção fármaco:polímero de 0,5:1, pela técnica de reidratação de filme e 30 segundos de sonicação. Foram obtidas partículas de aproximadamente 50nm capazes de encapsular até 90% de idebenona em relação à quantidade de polímero utilizado. Com relação à estabilidade

as mesmas foram capazes de conservar as capacidades antioxidantes da idebenona por até 4 semanas quando exposta à temperatura ambiente ou refrigeração. Assim, pode-se dizer que o polímero alquilado foi capaz de cumprir com seu objetivo, produzindo partículas capazes de viabilizar o uso da idebenona em futuras aplicações em formulações cosméticas.

Palavras-chave: Aminação Redutiva, Idebenona, Galactomanana.

ABSTRACT

Idebenone is an antioxidant analogous of coenzyme Q10 (Ubiquinone), present in the electron transport chain. A major challenge that lies in the use of such a drug is its low stability in shelf conditions, in addition to high hydrophobicity and irritating potential. Thus, it is proposed its encapsulation, in order to facilitate its application and storage. To this end, it was suggested the creation of a polymeric system capable of creating hydrophobic environments that can interact with idebenone. For the manufacture of this system, we opted for the natural polymer guar gum, due to its low cost and ease of obtaining. After purification, the modification was initiated with the oxidation of the gum with the TEMPO/NaClO system reagent at pH 9.3, at 3 °C with N₂ purging; and subsequent alkylation using dodecylamine and sodium cyanoborohydrate at pH 5.0 to 25 °C. The reactions were optimized in order to determine the best oxidative condition for the generation of aldehydes that react by reductive amination with dodecylamine. After alkylation of galactomannan, the carbon chains of dodecylamine are expected to interact, creating a kind of polymeric environment capable to encapsulate idebenone. After this reaction, oxidized (OX) and alkylated (ALQ) galactomannans were characterized by FTIR and NMR, respectively, where the occurrence of reaction was confirmed by increasing band intensity at 1730cm⁻¹ by FTIR and displacement of H-6 signaling of free mannose by NMR. The surfactant capacity of alkylated galactomannan was proved by tensiometry, where a reduction in the surface tension of the solution of 1 mg mL⁻¹ was of approximately 30 mN.m⁻¹, when compared to pure water. A pyrene fluorescent probe was also used to determine the saturation point of the ALQ polymer, i.e., the minimum concentration required for galactomannan to form self-associated particles, and this concentration was determined at approximately 0.5 mg.ml⁻¹. Different encapsulation techniques were also tested, as well as the sonication time of the particles and the proportion of drug:polymer in order to achieve the highest possible encapsulation. Thus, solutions at 1 mg mL⁻¹ of alkylated galactomannan with a drug:polymer ratio of 0.5:1 were used for idebenone encapsulation, using film rehydration technique and 30 seconds of sonication. Particles of approximately 50nm capable of encapsulating up to 90% of idebenone in relation to the amount of polymer used were obtained. Regarding stability, they were able to conserve the antioxidant capacities of idebenone for up to 4 weeks when exposed to room temperature or refrigeration. Thus, it can be said that the alkylated polymer was able to fulfill its

objective, producing particles of idebenone enabling future applications in cosmetic formulations.

Keywords: Reductive Amination, Idebenone, Galactomannan.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Comparação entre as representações esquemáticas das estruturas da idebenona e da ubiquinona (CoQ-10).....	4
Figura 2. Representação esquemática da estrutura química da goma guar	6
Figura 3. Representação esquemática da formação do íon nitrozônio a partir de TEMPO pela ação do hipoclorito (OCl^-), a sua conversão à hidroxilamina após a oxidação do álcool primário a aldeído e sua posterior conversão à carboxilato.....	8
Figura 4. Representação esquemática do mecanismo proposto para a conversão de álcool primário a aldeído pelo reagente TEMPO.....	9
Figura 5. Representação esquemática do mecanismo da reação de aminação redutiva	10
Figura 6. Espectro de infravermelho obtido para a idebenona com seus assinalamentos químicos mais relevantes destacados.....	25
Figura 7. Perfil de eluição da idebenona por CLAE (A) e curva de calibração utilizada na quantificação da idebenona realizada em concentrações entre 2 e $10\mu\text{g.mL}^{-1}$ (B) com fase móvel composta por metanol a 80% em água, coluna Symmetry C18, a 30°C	27
Figura 8. Determinação da quantidade de grupos carboxílicos formados na reação de oxidação da galactomanana com o catalizador TEMPO, realizados a 3°C , usando água como solvente. A concentração de galactomanana foi de 1mg.mL^{-1} , a concentração do NaOH utilizado foi $0,05\text{mol.L}^{-1}$	29
Figura 9. Espectro de RMN obtido para a galactomanana nativa (A) e oxidada pela condição 6	34
Figura 10. Espectro de RMN de HSQC da fração Ox.	35
Figura 11. Espectro de RMN de ^1H das frações Ox-D e Alq.....	36
Figura 12. Espectro de RMN de ^1H das frações Ox-D e Alq.....	37
Figura 13. Determinação da tensão superficial para as galactomanana nativa e oxidada pelas condições Ox 2 e Ox8 (A); a alquiladas pelas condições Alq1(D), Alq2 (E) e Alq3 (F).....	39
Figura 14. Isoterma de adsorção da galactomanana Alquilada (Alq3) em função da concentração a uma temperatura de 25°C	40

Figura 15. Gráficos da razão entre as intensidades das bandas I/III pela concentração de galactomanana, galactomanana oxidada (Ox 8) e galactomanana alquilada (Alq 4).	41
Figura 16. Isoterma da razão banda I/III do espectro de fluorescência do pireno em galactomanana Alquilada (Alq3) em função da sua concentração a 25 °C.	43
Figura 17. Eficiência de encapsulamento (em %) para formulações preparadas com diferentes concentrações de fármaco utilizando concentração constante de polímero a 1mg.mL ⁻¹	47
Figura 18. Cinética de liberação da idebenona obtida utilizando-se 2,5mg de idebenona em 50mL de solução etanólica 50%(v/v) em água (A) e solução etanólica 30% (v/v) em água (B) como meio a 37 °C	50
Figura 19. Imagens de AFM para os polímeros nativo (A), oxidado (B) e alquilado (C) e para as partículas (D) no modo contato intermitente usando como substrato silício	51
Figura 20. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica das amostras de partículas obtidas pela formulação E1.	Erro! Indicador não definido.
Figura 21. Gráficos obtidos da razão das porcentagens de inibição (porcentagem de inibição obtida para as partículas em água/ porcentagem de inibição obtida para a idebenona livre em etanol) para as suspensões acondicionadas em geladeira (8-10 °C) e em temperatura ambiente (15-26 °C) pelo tempo de 4 semanas para os métodos do ABTS (A) e DPPH (B).....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Condições utilizadas para a otimização da reação de oxidação de galactomanana de goma guar (fração GM) com TEMPO/NaClO em pH 9,3 e a 3 °C	12
Tabela 2. Resumo das formulações utilizadas no encapsulamento da idebenona. ..	20
Tabela 3. Deslocamentos químicos e suas respectivas deformações presentes no espectro de infravermelho da idebenona.	26
Tabela 4 Otimização da reação de oxidação da galactomanana com TEMPO para a formação do derivado de galactomanana com maior teor de grupos com aldeído em C-6.	31
Tabela 5 Assinalamentos de RMN de HSQC-editado da fração Ox	35
Tabela 6. Potenciais zeta obtidos para os polímeros nativo, oxidado, alquilado e para a amostra Ox-DDC, em duas concentrações 0,1 e 1,0 mg.mL ⁻¹ , a temperatura de 25 °C.	44
Tabela 7. Diâmetros hidrodinâmicos encontrados para os quatro métodos de encapsulamento.	45
Tabela 8 Diâmetros hidrodinâmicos obtidos após teste de sonicação da amostra E1.	46

LISTA DE ABREVIações, SÍMBOLOS E SIGLAS

ABTS - 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico

AFM – Microscopia de força atômica (*Atomic force microscopy*)

Alq - Galactomanana alquilada

ATR-FTIR – Espectroscopia de refletância total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier

AVE – Acidente vascular encefálico

CMC - Concentração micelar crítica
de alta eficiência)

DLS - Espalhamento de luz dinâmico (*Dynamic light scattering*)

DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

HPLC/CLAE - *High performance liquid chromatography* (cromatografia líquida

HSQC - *Heteronuclear Single Quantum Coherence*

Mn - Massa molar média-numérica

Mw - Massa molar média-ponderal

NaBH₄ – Boroidreto de sódio

NaCl – Cloreto de Sódio

NaCNBH₄ – Cianoboroidreto de sódio

Ox - Galactomanana oxidada

Ox-DDC – Galactomanana oxidada e dodecilamina

RMN - Ressonância magnética nuclear

RMN H¹- Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

SEC - *Size exclusion chromatography* (cromatografia de exclusão por tamanho)

TEMPO - (2,2,6,6-tetrametil-piperidi-1-yl)óxido

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	OBJETIVOS	2
1.1.1	Objetivo Geral.....	2
1.1.2	Objetivos Específicos	2
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1	IDEBENONA	3
2.2	GOMA GUAR	5
2.3	MODIFICAÇÕES QUÍMICAS EM GALACTOMANANAS: OXIDAÇÃO E ALQUILAÇÃO	7
3	MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1	MATERIAIS	11
3.2	OXIDAÇÃO E ALQUILAÇÃO DA GALACTOMANANA	11
3.3	MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS E CROMATOGRÁFICOS.....	14
3.3.1	Espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	14
3.3.2	Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	14
3.3.3	Cromatografia de Exclusão por Tamanho (SEC).....	14
3.3.4	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	15
3.4	MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS	15
3.4.1	Determinação da Tensão Superficial das amostras	15
3.4.2	Fluorimetria com sonda de pireno	16
3.4.3	Espalhamento de Luz Dinâmico	17
3.4.4	Microscopia de Força Atômica	17
3.4.5	Potencial Zeta.....	17
3.5	ENCAPSULAMENTO DA IDEBENONA EM NANOPARTÍCULAS DE GALACTOMANANA	18
3.5.1	Nanoprecipitação.....	18
3.5.2	Reidratação de filme.....	18
3.5.3	Teste de Sonicação	20
3.6	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	20
3.6.1	Espalhamento de Luz Dinâmico	21
3.6.2	Microscopia de Força Atômica	21
3.6.3	Potencial Zeta.....	21

3.6.4	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	21
3.6.5	Eficiência de encapsulamento	21
3.6.6	Avaliação da estabilidade das partículas contendo idebenona	22
3.6.7	Cinética de liberação do Fármaco	22
3.7	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	22
3.7.1	Ensaio do Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH).....	23
3.7.2	Ensaio do Radical ácido'2,2'-azino-bis(3-ethylbenzotiazolino-6-sulfônico) (ABTS) 23	
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA IDEBENONA.....	24
4.1.1	Caracterização da Idebenona por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier.....	25
4.1.2	Quantificação da Idebenona por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) 26	
4.2	OTIMIZAÇÃO DA REAÇÃO DE OXIDAÇÃO	27
4.3	OTIMIZAÇÃO DA REAÇÃO DE ENXERTIA DA CADEIA POLIMÉRICA	32
4.4	CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS.....	33
4.4.1	Ressonância Magnética Nuclear	33
4.4.2	Cromatografia de Exclusão por Tamanho	37
4.4.3	Determinação da Tensão Superficial.....	38
4.4.4	Fluorimetria com Sonda de Pireno	41
4.4.5	Estabilidade Coloidal	43
4.5	CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS OBTIDAS	44
4.5.1	Determinação do tamanho das partículas	45
4.5.2	Eficiência de encapsulamento	47
4.5.3	Cinética de Liberação	47
4.5.4	Microscopia de Força Atômica	51
4.5.5	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	52
4.5.6	Estabilidade do Sistema	53
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	56
	REFERÊNCIAS.....	57

1 INTRODUÇÃO

A idebenona é um análogo da coenzima Q-10 (ubiquinona) utilizado no tratamento de diversas doenças neurodegenerativas como o mal de Alzheimer e a ataxia de Friedreich. Além de seu uso já consolidado como fármaco de uso interno, a idebenona também é amplamente utilizada como cosmético devido a seu poder antioxidante. Apesar de apresentar vantagens como o mecanismo de ação, inibindo a formação de radicais livres na cadeia de transporte de elétrons, e a estabilidade relativamente maior que a dos demais antioxidantes, a idebenona apresenta vários desafios tecnológicos como: a) mesmo que a sua estabilidade seja considerada maior que os demais antioxidantes, ela é considerada de baixa estabilidade química, assim como os demais antioxidantes; b) a baixa hidrossolubilidade dificulta a sua aplicação em formulações cosméticas devido às barreiras farmacotécnicas e c) há relatos de dermatite relacionada à idebenona presente em cremes *anti-aging* (MC ALEER; COLLINS, 2008). Assim, além do problema farmacotécnico da solubilidade, a irritação cutânea da idebenona podem ser fatores limitantes em aplicações cosméticas.

Com base na problemática apresentada, especulou-se neste trabalho que nanopartículas poliméricas seriam capazes de carrear a idebenona, melhorar a solubilidade em água ou soluções aquosas e reduzir a irritação cutânea, por diminuir a concentração de fármaco livre em solução. Para o desenvolvimento dessas nanopartículas poliméricas optou-se pelo uso de galactomanana (goma guar) por ser de fonte renovável, oriundo de matriz vegetal e pelo seu já extenso uso pela indústria farmacêutica e facilidade de obtenção. Adicionalmente, é um biopolímero abundante na natureza, de baixa toxicidade e alta biocompatibilidade e biodegradabilidade. Entretanto, apesar de todas estas vantagens citadas a galactomanana não possui a capacidade de se auto associar formando partículas capazes de encapsular substâncias hidrofóbicas, assim a mesma demanda modificações químicas para tal finalidade.

Entre as múltiplas possibilidades de modificação química, optou-se pela inserção de grupos alquila na galactomanana, através de uma alquilação por aminação reductiva, gerando uma molécula anfifílica, com potencial de auto associação e criando ambientes propícios para a encapsulação da idebenona. A hipótese é de que o novo polímero desenvolvido seria capaz de encapsular a idebenona em

nanopartículas de galactomanana-alquilada, gerando um aumento de solubilidade e da estabilidade do fármaco com antioxidante, facilitando, assim, o seu emprego em produtos cosméticos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Desenvolver e avaliar nanopartículas poliméricas contendo idebenona a partir da modificação química de galactomanana.

1.1.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do trabalho são:

- a) Purificar a galactomanana obtida comercialmente;
- b) Otimizar as reações de oxidação e alquilação da galactomanana usando catalisador TEMPO;
- c) Realizar reações de oxidação e alquilação da galactomanana na presença de dodecilamina, em condições otimizadas de reação;
- d) Caracterizar a galactomanana e seus derivados, assim como idebenona, por meio de técnicas químicas e espectroscópicas;
- e) Analisar os efeitos das modificações realizadas sobre as características físico-químicas dos polímeros;
- f) Encapsular a idebenona com o polímero alquilado;
- g) Caracterizar as nanopartículas contendo Idebenona;
- h) Determinar a capacidade da idebenona encapsulada de manter sua atividade antioxidante ao longo do tempo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 IDEBENONA

A idebenona (**figura 1**) 2-(10-hidroxi-decil)-5,6-dimetoxi-3-metil-[1,4]benzoquinona possui fórmula $C_{19}H_{30}O_5$ e é um potente antioxidante capaz de atuar em ambientes biológicos com baixos níveis de oxigênio (ZIPORI *et al.*, 2016). É um análogo sintético de cadeia curta da coenzima Q-10 (Ubiquinona), um transportador de elétrons lipofílico da cadeia de transporte de elétrons, apresentando a mesma capacidade de estabilizar um elétron em sua estrutura, devido à presença de seu núcleo 1,4-benzoquinona. A idebenona se diferencia da ubiquinona (**figura 1**) apenas pela cadeia carbônica ligada ao carbono 2, sendo que a idebenona apresenta apenas 10 átomos de carbono ligados ao mesmo, enquanto a ubiquinona apresenta 50 átomos de carbono na forma de uma cadeia isoprenóide (MONTENEGRO; CASTELLI; SARPIETRO, 2018).

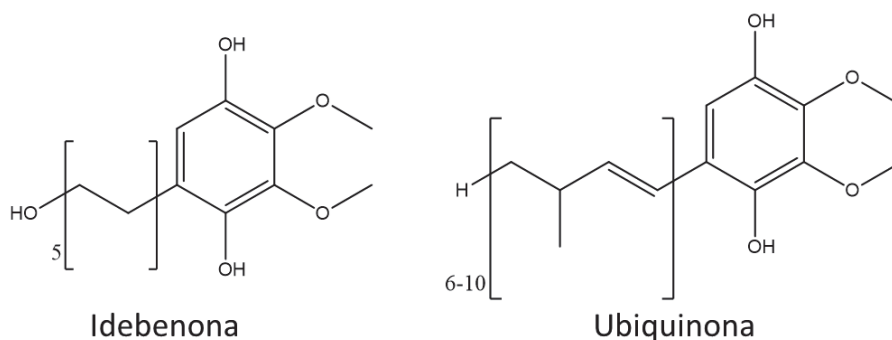
Foi desenvolvida pela Takeda Pharmaceuticals Co. para o tratamento de distúrbios decorrentes do acidente vascular encefálico (AVE) (ZIPORI *et al.*, 2016), mas seu uso já é amplamente descrito no tratamento de outras alterações de funções cognitivas, como Alzheimer, e ataxia de Friedreich (REQUETIM, 2013), além de estudos sobre seu uso no tratamento de neuropatia ótica hereditária de Leber (BARNILS *et al.*, 2007) e distrofia muscular de Duchenne (VALDUGA, 2016)

Devido a suas propriedades antioxidantes, pode ser utilizada na área cosmética na redução de manchas e rugas, além de penetrar a segunda camada da derme, alcançando camadas mais profundas que outros antioxidantes (ALBUQUERQUE *et al.*, 2014; LI; GE, 2012). McDaniel *et al.* (2005) comprovaram sua efetividade frente a antioxidantes tradicionais como o tocoferol, a cinetina, a ubiquinona, o ácido ascórbico e o ácido lipóico no tratamento de rugas finas causadas pelo foto-envelhecimento. A sua penetração na pele pode ser associada à sua menor massa molar, além de conferir a capacidade despigmentante à idebenona (OLIVEIRA, 2018).

A idebenona atua diretamente na cadeia de transporte de elétrons como transportador de elétrons e facilitando a formação de ATP e ativando a enzima NADH desidrogenase reduzindo a geração de espécies reativas de oxigênio. Justamente por este mecanismo de ação a idebenona tem sido empregada no tratamento de doenças

neurodegenerativas de etiologia mitocondrial (MONTENEGRO; CASTELLI; SARPIETRO, 2018).

Figura 1. Comparação entre as representações esquemáticas das estruturas da idebenona e da ubiquinona (CoQ-10)



Fonte: adaptado de Brendle (2013).

Apesar de seus efeitos benéficos à saúde a idebenona é pouco solúvel em água, além disso Sasseville *et al.* (2008) descreveu um caso de dermatite de contato após o uso de um creme contendo idebenona a 0,5%. Sendo principalmente empregada na forma oral para o tratamento de distúrbios neurodegenerativos, o aumento de seu caráter hidrofílico seria benéfico para o aumento de sua biodisponibilidade (PALUMBO *et al.*, 2002). Além da sua biodisponibilidade, a sua dispersibilidade em água seria uma estratégia benéfica para veicular a idebenona em formulações cosméticas, e reduzir o seu potencial irritativo. Assim, para facilitar a veiculação da idebenona em formulações cosméticas, muitos trabalhos sugerem sua incorporação em nanopartículas. A fim de melhorar ainda mais a permeação cutânea da idebenona, Kyadarkunte, Patole e Pokharkar (2015) desenvolveram nanopartículas lipídicas esféricas, com aproximadamente 140 nm de diâmetro capazes de atravessar a membrana celular.

Como tentativa de veicular a idebenona em nanopartículas, muitos estudos têm sido conduzidos. Como exemplo Montenegro *et al.* (2012) encapsulou a idebenona em nanopartículas lipídicas compostas por palmitato de cetila e três surfactantes não iônicos (*ceteth-20*, *isoceteth-20* e *oleth-20*) utilizando a técnica de temperatura de inversão de fase, onde uma fase aquosa foi lentamente adicionada sobre uma fase oleosa, contendo o lipídeo, os surfactantes e a idebenona, e posteriormente ambas

foram resfriadas produzindo as partículas com diâmetros de 30 a 49 nm que se acumularam nas camadas mais superficiais da epiderme.

Palumbo *et al.* (2002) também produziu com sucesso nanopartículas contendo idebenona pelo método de polimerização em emulsão. Para tanto foi preparada uma fase orgânica contendo a migliol 812, idebenona, o etil-2-cianoacrilato (monômero) e acetona que foi lentamente adicionada à água destilada contendo Tween 80. Na presença do surfactante ocorreu a polimerização do monômero na interface óleo-água produzindo partículas de polietil-2-cianoacrilato de 170 a 300 nm capazes de melhorar os efeitos antioxidantes da idebenona em nível mitocondrial possibilitando sua aplicação não só pela via oral, mas também pela via intravenosa.

Entre os diferentes polímeros citados em literatura em aplicações nanotecnológicas alguns merecem destaque, como os biopolímeros. Estes, além de produzir nanopartículas mais ecológicas, facilitam a produção das nanopartículas, visto que não existe a necessidade de um processo de polimerização. Amorim (2010) produziu nanopartículas a partir de quitosana e de N-carboximetilquitosana. Tais partículas foram preparadas pelo método de *spray drying* onde duas fases compostas pelo polímero em ácido e pela idebenona em etanol, respectivamente, foram misturadas e adicionadas de tripolifosfato antes de serem secas. As nanopartículas obtidas apresentaram diâmetros de cerca de 420 a 600 nm e foram capazes de manter a estabilidade da idebenona por 45 dias, frente a análises por HPLC, o que poderia possibilitar seu uso, não só por via tópica, mas também pela via nasal

No presente trabalho a modificação química da galactomanana por uma alquilação, através de uma aminação redutiva, será utilizada para formação de nanopartículas poliméricas. Aspectos associados à galactomanana e seus derivados serão apresentados no tópico 2.2.

2.2 GOMA GUAR

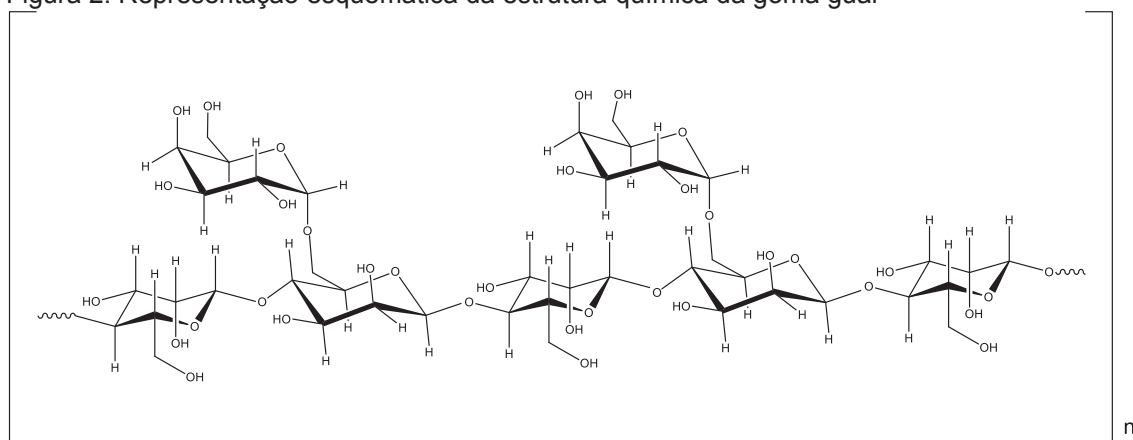
As galactomananas são polissacarídeos compostos por uma cadeia linear de unidades de β -D-manopiranosose ligadas 1 \rightarrow 4 com substituições por unidades de α -D-galactopiranosose ligadas 1 \rightarrow 6, sendo a proporção em que estas unidades se apresentam determinante nas suas propriedades físico-químicas (MCCLEARY, 1980). Podem ser provenientes de fungos (DEA, MORRINSON, 1975), líquens (WORANOVICZ *et al.*, 1997) e do endosperma de leguminosas, como a goma guar,

goma locusta e goma tara, onde atuam como polissacarídeos de reserva (SINGHA, OBERLY, TOWNSEND, 1987).

São polissacarídeos solúveis em água capazes de formar dispersões estáveis e altamente viscosas, a depender do pH e da temperatura (VIEIRA, 2003; MEER, MEER, TINKER, 1975). Apesar de serem considerados polímeros não iônicos podem apresentar teores baixos de ácido urônico, como Cunha *et al.* (2005) encontrou teores de aproximadamente 3,3% e Debon e Tester (2001) de 0,8% para a goma guar. Ressalta-se que a presença de grupos ácidos devem ser associados à contaminações por outros polissacarídeos durante a extração aquosa, ou a proteínas residuais.

As galactomananas mais amplamente utilizadas na indústria, principalmente alimentícia são as gomas guar (extraída de *Cyamopsis tetragonolobus* L.) e a alfarroba ou locusta (*Ceratonia siliqua* L.) (CUNHA, de PAULA, FEITOSA, 2009) sendo a principal diferença entre elas a proporção manose:galactose, sendo 4:1 para a primeira e 2:1 para a segunda, aproximadamente (**figura 2**).

Figura 2. Representação esquemática da estrutura química da goma guar



Adaptado de Silveira e Bresolin (2011)

A goma guar, conforme já citado, é uma galactomanana extraída do endosperma das sementes de *Cyamopsis tetragonolobus* L. podendo constituir cerca de 80% de seu endosperma (GEORGE; SHAH; SHRIVASTAV, 2019). É originária da Índia e do Paquistão (SITTIKJYOTHIN *et al.*, 2005) e, assim como todos os polissacarídeos de reserva, tem função essencial na germinação das sementes, servindo como fonte de energia no processo de desenvolvimento do novo broto.

A goma guar, além ser um polímero de baixo custo, movimentou quase 2 bilhões de dólares em 2019, totalizando 1,5 bilhões de quilos de goma importada no

Brasil (COMEXSTAT, 2020). Além disso, a goma guar apresenta baixa toxicidade, sendo amplamente utilizada na indústria alimentícia.

Como a solubilidade das galactomanana é proporcional à quantidade de galactoses ligadas à sua cadeia principal (SILVEIRA e BRESOLIN, 2011) a goma guar apresenta nova vantagem quando comparada aos demais biopolímeros. Como ele possui elevada solubilidade em água, é possível que a inserção de grupos alquil, na estrutura da galactomanana, favoreceria a autoassociação do novo polímero, criando uma estrutura anfifílica.

Como forma de agregar valor à goma guar muito se tem estudado com relação à possibilidade de modificar sua estrutura, seja por sua oxidação, sulfatação ou adição de grupamentos, a fim de modificar suas propriedades físico-químicas tornando-a um melhor espessante, emulsificante ou conferir-lhe propriedades totalmente novas, como o caso do cloreto de hidroxipropiltrimetilamônio guar (registrado pela Volp Indústria e Comércio Ltda. como Jaguar C-13S®) que gera efeito condicionante a produtos cosméticos.

Soumya *et al.* (2010) desenvolveu nanopartículas de goma guar, utilizando métodos mais drásticos e demorados com a necessidade de surfactantes. Para tanto os autores hidrolisaram a goma guar e, posteriormente, as partículas foram formadas por nanoprecipitação pela adição de solventes orgânicos à solução de goma despolimerizada contendo surfactantes como triton X-100, tween 20 e tripolifosfato para que ocorra a reticulação.

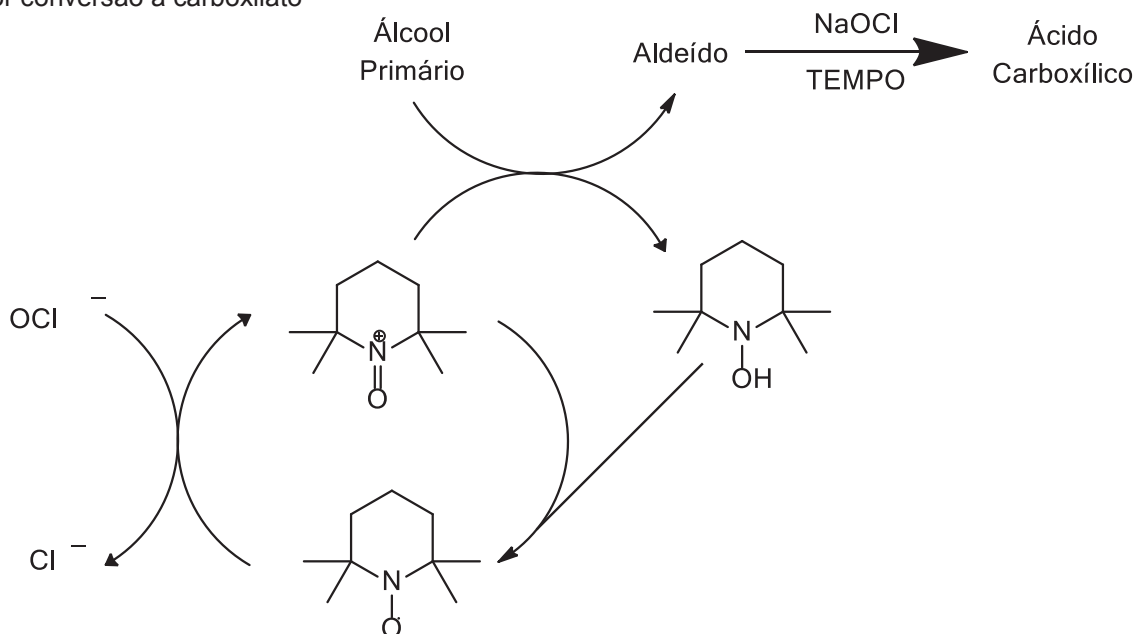
2.3 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS EM GALACTOMANANAS: OXIDAÇÃO E ALQUILAÇÃO

No presente trabalho a reação de alquilação escolhida foi proposta por Sierakowski *et al.* (2000) como uma forma de enxertar uma cadeia alquílica à estrutura da galactomanana através do mecanismo de aminação redutiva. Primeiramente, os álcoois presentes na estrutura do polissacarídeo precisam ser oxidados a aldeído ou ácido carboxílico. Tal reação ocorre pela ação do catalizador radicalar N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO) na sua forma oxidada, o íon nitrosônio, que além de apresentar seletividade por álcool primário, permite que a reação ocorra em condições mais brandas.

De Nooy *et al.* (1995) descrevem a utilização de hipoclorito, brometo de sódio e o TEMPO como catalizadores na oxidação seletiva de álcoois primários. Nas condições citadas o sistema NaOCl/NaBr converte o radical TEMPO à íon nitrozônio que atua como oxidante primário, sendo convertido em hidroxilamina ao final da reação.

No presente trabalho optou-se por suprimir o reagente NaBr com forma de cancelar o reciclo do catalizador TEMPO a íon nitrozônio (catalizador efetivo na reação de oxidação), fazendo assim com que o TEMPO, uma vez convertido a hidroxilamina não retorne à reação (**figura 3**), evitando-se assim uma formação mínima de ácido carboxílico no polímero, numa tentativa de aumentar a quantidade de grupos aldeídos na cadeia polimérica.

Figura 3. Representação esquemática da formação do íon nitrozônio a partir de TEMPO pela ação do hipoclorito (OCl^-), a sua conversão à hidroxilamina após a oxidação do álcool primário a aldeído e sua posterior conversão à carboxilato

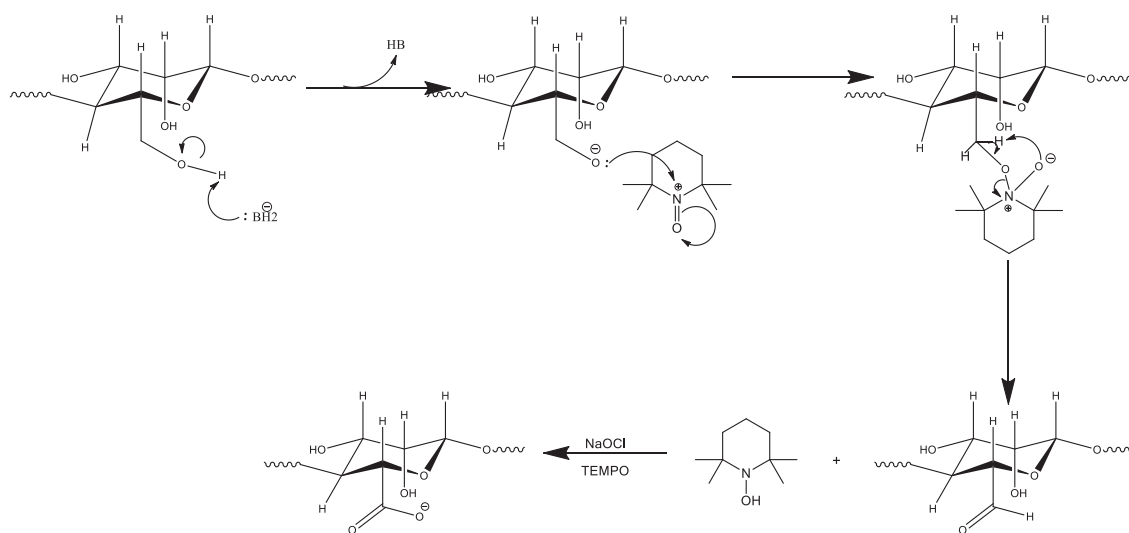


Adaptado de: Bragd *et al.* (2000)

Juntamente com a formação do íon nitrozônio ocorre a formação de uma base conjugada da hidroxila do álcool primário da unidade polissacarídica, em função do meio alcalino usado na reação. O alcóxido gerado (base conjugada) é formado a partir de um ataque básico (**figura 4**), fazendo com que o oxigênio adquira carga negativa (alcóxido), possibilitando um ataque nucleofílico com o íon nitrozônio, transferindo esta carga negativa para o oxigênio do reagente TEMPO. Este oxigênio, então ataca o hidrogênio do carbono do polissacarídeo e o par de elétrons da ligação passa para

a ligação com o oxigênio, gerando o aldeído e a hidroxilamina. No sistema descrito acima o TEMPO seria novamente convertido e ocorre a oxidação de aldeído à ácido carboxílico (ISOGAI; SAITO; FUKUZUMI 2011).

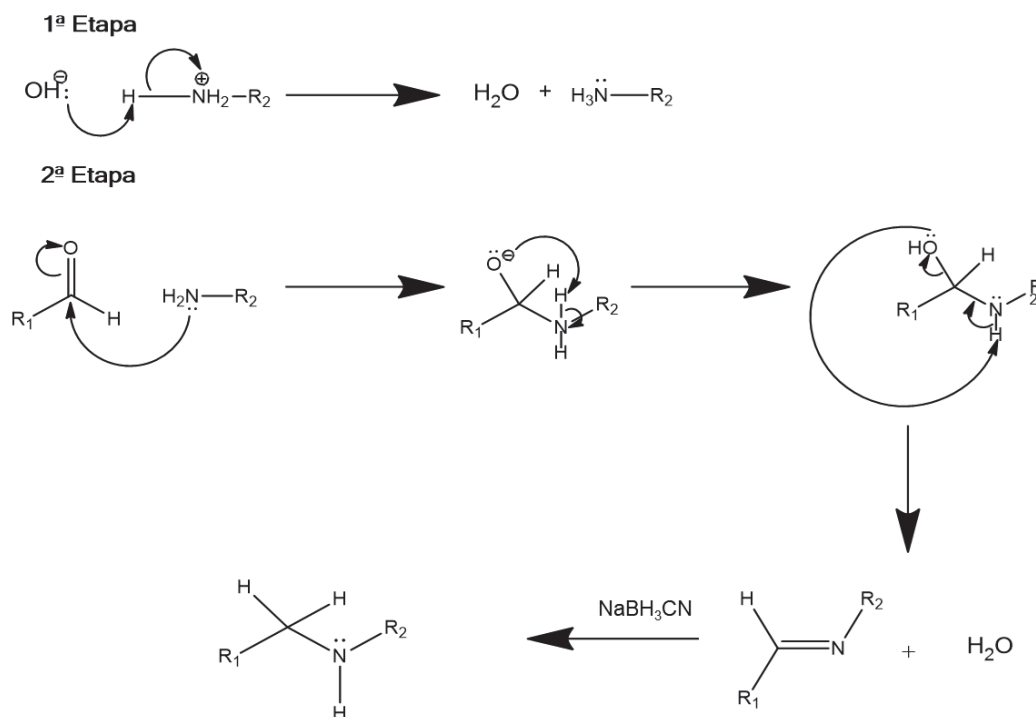
Figura 4. Representação esquemática do mecanismo proposto para a conversão de álcool primário a aldeído pelo reagente TEMPO



Adaptado de: Isogai; Saito e Fukuzumi (2011)

Após a oxidação do álcool a aldeído o mesmo pode reagir com aminoalquilas para a sua inserção na cadeia polimérica. O mecanismo proposto para a reação (figura 5) sugere que, em meio aquoso, uma hidroxila abstrai um hidrogênio da aminoalquila, gerando assim uma amina primária na primeira etapa. Após a formação desta amina o seu par de elétrons ataca o carbono da carbonila, deslocando o par de elétrons da dupla ligação para o seu oxigênio. Este oxigênio remove, então, um hidrogênio da amina liberando uma molécula de água e reestabelecendo a dupla ligação, gerando, assim, uma imina. Esta imina é então reduzida pelo íon cianoborohidreto, gerando uma amina secundária ligada a C-6 do polímero (SILVA, 2007).

Figura 5. Representação esquemática do mecanismo da reação de aminação reductiva



Adaptado de: Colodi (2017).

Além da galactomanana outros polímeros podem ser modificados a fim de participarem na vetorização de fármacos, como descrito por Amorim (2010) que realizou a reação de N-carboximetilação da quitosana a fim de obter, também, nanopartículas capazes de encapsular o antioxidante idebenona a partir do *cross-linking* entre o polímero e o tripolifosfato. Cunha (2006) também carboximetilou a quitina, outro polissacarídeo similar à quitosana. O polímero obtido foi utilizado no tratamento da osteoartrite na forma de géis intra-articulares, juntamente com a goma guar sulfatada e oxidada.

Spier *et al.* (2017) realizou reações de oxidação de álcoois primários em xiloglucana de semente de tamarindo (*Tamarindus indica* L.) pelo método supracitado, porém otimizando as quantidades dos oxidantes primário (TEMPO) e secundário (NaClO). Em seu trabalho percebeu que quantidades muito grandes de oxidante secundário podem induzir a despolimerização do polissacarídeo, indicando assim que o TEMPO teria um papel protetor por induzir a oxidação seletiva dos álcoois primários da cadeia polimérica a partir de seu “sacrifício”, sem, porém, impedir totalmente a despolimerização. Assim, a fim de se diminuir a despolimerização, quantidades maiores de TEMPO devem ser adicionadas ao meio. A autora comprovou, também a

formação de ácido urônico durante a reação e a utilidade de seu monitoramento no acompanhamento da reação em tempo real.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

A goma guar utilizada foi obtida comercialmente da Sigma-Aldrich® (Lote: 100M0221V). Realizou-se uma purificação do polissacarídeo, para remoção de material particulado insolúvel, como restos da casca das sementes das quais provém, e de oligossacarídeos de baixa massa molar. A goma guar foi dispersada em água sob agitação mecânica por 24h, e posteriormente centrifugada a 10^4 g por 20 min e precipitada com 2 volumes de etanol a 5°C. A dispersão foi centrifugada e lavada por mais 2 vezes com etanol a 5°C e, posteriormente com uma solução de etanol:acetona 1:1 e seca em estufa a 40 °C.

A idebenona utilizada foi adquirida na farmácia de manipulação Miligrama de Curitiba, PR. A pureza da idebenona adquirida foi avaliada por métodos espectroscópicos de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio (^1H), espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) conforme descrito nos itens 3.3.2; 3.3.1 e 3.3.4.

Os reagentes utilizados para as análises de atividade antioxidantes foram adquiridos da Sigma-Aldrich®. As membranas de diálise utilizadas foram de éster de celulose, com poro de 25 kDa. Todos os solventes utilizados no presente projeto possuíam grau analítico.

3.2 OXIDAÇÃO E ALQUILAÇÃO DA GALACTOMANANA

A reação de oxidação foi realizada de acordo com Sierakowski *et al.* (2000) e modificada com base no descrito por Spier *et al.* (2017) que definiu que concentrações mais altas do reagente TEMPO e baixas concentrações dos oxidantes secundários, como hipoclorito e hipobromito, gerando uma oxidação mais seletiva em álcool primário e reduzindo adicionalmente o processo de despolimerização.

Para a reação de oxidação, 500 mg da galactomanana foram dissolvidos em 500mL de água sob agitação magnética. A dispersão coloidal resultante foi arrefecida a uma temperatura de 3 °C com purga de nitrogênio gasoso (N_2). Ao meio reacional

foram adicionados 1,5 mL de uma solução a 12% (v/v) de hipoclorito de sódio. O pH do meio foi ajustado para 9,3 com uma solução de HCl a 0,01% (v/v) e foi adicionado o catalizador TEMPO (N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina). O pH do meio reacional foi mantido em 9,3 através da adição de NaOH 0,05 mol.L⁻¹. A reação foi acompanhada por 5h. Decorrido este tempo, foram adicionados 10 mL de etanol e a dispersão resultante foi mantida sob agitação por mais 30 min. Terminada a reação de oxidação uma alíquota foi retirada, dialisada, liofilizada e analisada por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H). As condições utilizadas na otimização da etapa de oxidação encontram-se na tabela 1.

Tabela 1 Condições utilizadas para a otimização da reação de oxidação de galactomanana de goma guar (fração GM) com TEMPO/NaClO em pH 9,3 e a 3 °C

Reação	TEMPO (mmol.L ⁻¹)	NaClO (mmol.L ⁻¹)	Razão Tempo/NaClO
1 ^a	0,083	12,5	6,64x10 ⁻³
2 ^a	0,083	9,4	8,83x10 ⁻³
3 ^a	0,166	9,4	1,77x10 ⁻²
4 ^b	0,332	18,7	1,77x10 ⁻²
5 ^b	0,664	37,9	1,76x10 ⁻²
6 ^b	1,328	74,8	1,77X10 ⁻²

^a As reações foram acompanhadas nos tempos de 1, 2, 3 e 4h. ^b reações realizadas em 1h.

FONTE: A autora (2020)

Para a segunda etapa de reação a temperatura do meio reacional foi elevada a 25 °C e foram adicionados o NaCNBH₃ (5,4 mmol.L⁻¹) e a dodecilamina (0,6 mmol.L⁻¹) em seguida. A solução permaneceu por 16h sob agitação magnética. Decorrido este tempo, foi adicionado o NaBH₄ (2,7 mmol.L⁻¹) e a dispersão foi dialisada, congelada, liofilizada e analisada por RMN ¹H e FTIR. A reação de alquilação foi realizada logo em seguida a reação de oxidação no mesmo reator, sendo assim caracterizada a reação como “*one pot*”. Todos os reagentes foram previamente solubilizados em 1 mL de água, a exceção da dodecilamina que foi solubilizada em 1 mL de etanol.

Como forma de controle foi preparada uma amostra gerada pela mistura física do polímero oxidado com dodecilamina na mesma proporção utilizada na reação, e mantido em agitação por 16 h, após o que a dispersão foi dialisada e liofilizada. Esta amostra foi nomeada de Ox-DDC e foi preparada a fim de se pesquisar a presença de possíveis moléculas de dodecilamina ligadas aos aldeídos do polímero oxidado meramente por interações eletrostáticas.

A reação de enxertia foi, também, otimizada. A primeira condição testada foi realizada, também, segundo Sierakowski *et al.* (2000) em que o pH é mantido em 9,3, a temperatura elevada a 25 °C e os reagentes NaCNBH₃ e dodecilamina (DDC) suficientes para se obter a concentração final de 5,4 mmol.L⁻¹ e 0,6 mmol.L⁻¹, respectivamente, adicionados. Após 16 h de reação 85 mg de NaBH₄ foram adicionados e a reação mantida sob agitação por 30 min. Após a amostra foi dialisada, liofilizada e analisada por FTIR. Esta condição já descrita em literatura foi denominada de Alq 1.

Para todas as reações uma alíquota foi retirada após a oxidação e antes da alquilação, ela foi dialisada e liofilizada para ser utilizada como referência em estudos comparativos por FTIR. Além da goma oxidada os espectros de FTIR foram comparados com uma porção de goma oxidada misturada com quantidade proporcional de DDC (Ox-DDC), dialisada e liofilizada. Este controle foi realizado a fim de se avaliar se a reação de alquilação realmente ocorreu ou se a dodecilamina estava apenas interagindo eletrostaticamente com os grupos formados na oxidação.

Observou-se, porém que a solubilidade da dodecilamina aumenta em pH ácido, provavelmente devido à adição de um próton à amina (pKa 10.6). Assim, pensou-se ajustar o pH do meio para 5,0 entre a reação de oxidação e a de aminação, pois neste pH considera-se que o grau de protonação é máximo, assim como a solubilidade. Este ajuste de pH auxilia não só na solubilização da dodecilamina, mas também garante o término da reação de oxidação, por impedir a formação de alcóxidos. Assim, após a reação de oxidação o pH do meio foi ajustado a 5,0 pela adição de HCl 0,05mol.L⁻¹, sendo nomeada de Alq 2.

Por fim, para aumentar o rendimento da alquilação os reagentes tiveram suas quantidades duplicadas proporcionalmente, ainda em pH 5,0. Esta nova condição foi nomeada Alq 3.

3.3 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS E CROMATOGRÁFICOS

3.3.1 Espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As análises de FTIR foram realizadas usando um espectrofotômetro FT-IR ALPHA com transformada de Fourier da Bruker com acumulação de 16 scans, resolução de 4 cm^{-1} e comprimento de onda de 400 a 4000 cm^{-1} . As amostras foram colocadas diretamente em contato com o laser e o espectro foi adquirido instantaneamente e analisado utilizando o software OPUS viewer (BRUKER). As análises foram realizadas no Centro de Estudos em Biofarmácia (CEB) na UFPR.

3.3.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de espectroscopia de ressonância magnética nuclear foram realizadas em equipamento Avance DRX Bruker 400 MHz. Para tanto cerca de 10mg de amostra foram pesados e dispersos em 0,2 mL de água deuterada e mantidos sob agitação. As amostras foram, então, congeladas e liofilizadas, e novamente ressuspensas em D_2O . Este processo foi repetido duas vezes para evitar a presença de água nas amostras. Ao final as dispersões foram transferidas para tubos de RMN e enviadas para o Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (LabRMN) da UFPR, onde foram analisadas a $70\text{ }^\circ\text{C}$.

3.3.3 Cromatografia de Exclusão por Tamanho (SEC)

A análise por cromatografia de exclusão por tamanho de alto desempenho foi realizada a $25\text{ }^\circ\text{C}$ usando um sistema multi-detector da Viscotek-SEC equipado com uma coluna OH-Pack Shodex SB- 806 M HQ com limite de exclusão de $2 \times 10^7\text{ g.mol}^{-1}$. O sistema multi-detector consiste de um detector de espalhamento de luz a 90° e 7° , e um detector de índice de refração (RI) Viscotec model (VE3580) e em um viscosímetro. O eluente utilizado foi nitrato de sódio $0,1\text{ mol.L}^{-1}$ contendo 200 ppm de azida. Os polissacarídeos foram dissolvidos no próprio eluente a 1 mg.mL^{-1} e filtrados por membrana de celulose de poro de $0,22\text{ }\mu\text{m}$ antes da injeção.

Os resultados foram analisados pelo software OmniSEC (Malvern. Co., USA). Para o polímero nativo o dn/dc utilizado foi segundo Sakakibara, *et al.* (2016). Para o polímero alquilado a coluna foi desacoplada do equipamento e as amostras

dissolvidas no eluente em 5 concentrações diferentes (0,1-0,6 mg.mL⁻¹) e filtradas em membrana de celulose de poro de 0,22 µm antes da injeção. A partir desta análise foi possível determinar a massa molar média numérica (M_n) e média ponderal (M_w) e a dispersão (Đ=M_w/M_n).

3.3.4 Cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE)

A análise por CLAE foi realizada segundo Amorim *et al.* (2009) em cromatógrafo Prominence (Shimadzu) com coluna Symmetry C18 (4,6 x 250 mm, partículas de 5 µm), a 30 °C. Com volume de amostra de 10 µL e fase móvel composta por metanol a 80% em água com fluxo de 1 mL.min⁻¹, detecção a 280nm e 10 min de tempo de corrida. A curva padrão foi feita em triplicata com dupla injeção de 10 µL de padrão analítico adquirido da Sigma-Aldrich, diluído em 5 concentrações diferentes entre 2 a 10 µg.mL⁻¹ preparadas na própria fase-móvel. Para a análise da curva foram determinados os limites de detecção (LD) e quantificação(LQ) a partir da equação da reta, sendo o LD expresso pela multiplicação do fator 3,3 pela divisão entre *intercept* e *slope* dados pela regreção linear da reta e o LQ pela multiplicação desta divisão pelo fator 10. Foram também calculados os resíduos para a curva analítica a partir da subtração entre os valores médios e os valores obtidos de área obtidos em cada triplicata para cada concentração.

3.4 MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS

3.4.1 Determinação da Tensão Superficial das amostras

As análises de tensiometria foram realizadas juntamente com a aluna do programa de voluntariado acadêmico do Curso de Farmácia Isabella Peres. As análises foram realizadas para a galactomanana nativa, oxidada e alquilada, bem como para a dodecilamina livre a fim de determinar se a possível interação eletrostática da mesma com a galactomanana oxidada poderia estar gerando algum artefato. Elas foram realizadas pelo método da gota pendente utilizando um sistema de tensiometria OCA15. Para tanto, os polímeros foram dissolvidos em água ultrapura em concentrações entre 1.10⁻³ e 1 mg.mL⁻¹. As gotas pendentes tiveram suas curvaturas analisadas, em modo dinâmico, pelo software durante 3 min, sendo a média do último min utilizada no cálculo da tensão. Tal procedimento foi feito a fim de

dar tempo para que o polímero migre para a interface da gota e que as medidas fossem realizadas em condições de equilíbrio. Nesta metodologia, a tensão interfacial é determinada automaticamente pelo equipamento através da curvatura da gota aplicada na equação de Laplace-Young (SHAW, 1975):

$$P_i - P_e = (D - 1) \frac{\gamma}{R}$$

Onde:

P_i e P_e = pressão interna e externa, respectivamente

D = dimensão espacial

R = raio de curvatura da gota

γ = tensão superficial

Após a determinação da melhor condição reacional, a concentração de agregação crítica do polímero foi determinada. Este ponto seria o equivalente à concentração micelar crítica (CMC) para surfactantes, ou seja, é a concentração em que o polímero passaria a se autoassociar em estruturas semelhantes a micelas.

3.4.2 Fluorimetria com sonda de pireno

O pireno ($C_{20}H_{12}$) possui alta hidrofobicidade devido à sua própria estrutura além de possuir a capacidade de emitir 5 bandas vibrônicas quando excitado (BALDI; ATVAR, 2005). Dependendo do ambiente onde o pireno se encontra a intensidade destas bandas se modifica, sendo a Banda I (372 nm) mais proeminente em ambientes polares e a banda III (384 nm) mais proeminente em ambientes apolares. Assim, devido justamente à sua hidrofobicidade o pireno tem preferência por tais ambientes e, quando os encontra exibe uma banda III maior em relação à banda I. Esta relação pode, então, ser utilizada na determinação da formação de ambientes hidrofóbicos, como partículas e micelas.

A avaliação da presença de domínios hidrofóbicos em dispersões dos polímeros nativo, oxidado e alquilado, bem como o ponto de saturação do polímero alquilado, foi realizada, também, por este método. Para tanto, as amostras foram preparadas em uma solução de pireno em água à concentração de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ sob agitação magnética por 24 h. Após completa dispersão as amostras foram analisadas em espectrofotômetro de fluorescência F4500 (Hitachi) com excitação em 336 nm e varredura de 360 a 460 nm. As intensidades obtidas para as bandas I e III foram utilizadas na construção de um gráfico da razão pela concentração da amostra. Assim

o ponto de inflexão foi utilizado na determinação da concentração de agregação crítica (CAC).

3.4.3 Espalhamento de Luz Dinâmico

As amostras preparadas foram analisadas por espalhamento de luz dinâmico utilizando o equipamento Nano DLS da Brookhaven Instruments (Holtville, New York) utilizando um laser de He-Ne de 632nm a 90°. Nesta técnica, o tamanho hidrodinâmico do polímero e das partículas obtidas foi determinado em diferentes concentrações, visando caracterizar a formação de partículas. As soluções a 1mg/mL, referente ao polímero, foram diluídas em água ultrapura na proporção 1:10 e injetadas no equipamento em triplicada em análises de 20 min a 25 °C. Os dados foram analisados utilizando o software NanoDLS Particle Sizing Software (Brookhaven Instruments). Os diâmetros hidrodinâmicos (D_H) foram expressos pela média \pm desvio padrão.

3.4.4 Microscopia de Força Atômica

Os polímeros nativo e modificado, bem como as partículas foram analisados em microscópio de força atômica (AFM) Agilent 5500 microscope (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Para tanto, 100 μ L da amostra em água ultrapura foi depositada em superfície de sílica e seca em estufa a 40 °C. As imagens foram obtidas no modo de contato intermitente, adquiridas em área de 8 x 8 μ m e processadas utilizando os softwares Pico Image (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) e Gwyddion (Czech Metrology Institute), respectivamente.

3.4.5 Potencial Zeta

O potencial zeta da galactomanana nativa e modificadas quimicamente, bem como das partículas obtidas foi determinado em um sistema Stabino Particle Charge nas concentrações de 0,1 e 1mg.mL⁻¹, acima e abaixo do CAC, respectivamente. As amostras foram preparadas em solução de NaCl 0,01 mol.L⁻¹ e foram analisadas a 25°C.

3.5 ENCAPSULAMENTO DA IDEBENONA EM NANOPARTÍCULAS DE GALACTOMANANA

A encapsulação foi testada por dois métodos diferentes: a nanoprecipitação e a reidratação de filme.

3.5.1 Nanoprecipitação

O método foi realizado de acordo com Amorim *et al.* (2010) com algumas modificações. Para tanto, duas fases diferentes foram formadas: a primeira composta do polímero alquilado em água (100mg/100ml) e a segunda composta por 10mg de idebenona dissolvida em 10ml de etanol 96%. A segunda fase foi, então, adicionada gota a gota e sob agitação à primeira a fim de que, por apresentar baixa solubilidade em água a idebenona busque regiões de maior hidrofobicidade, interagindo com as cadeias apolares do polímero alquilado.

3.5.2 Reidratação de filme

O método de encapsulamento por reidratação de filme (KREUTZER, 2018) foi também otimizado. Inicialmente testou-se a solubilidade do polímero alquilado em solventes voláteis (clorofórmio, metanol, etanol, DMSO) sem sucesso, bem como a solubilização da idebenona em água pura, o que não foi possível; assim os testes prosseguiram com dispersões de galactomanana preparadas em tampão fosfato 0,1mol.L⁻¹ pH 7,2 e soluções etanólicas de idebenona.

Método E1: Primeiramente cerca de 10mg de idebenona foram dissolvidos em 1mL de etanol 96%, o etanol foi então evaporado de modo a formar um filme de idebenona na parede do balão. Este filme foi ressuspenso utilizando-se 10mL de uma dispersão de galactomanana alquilada a 1mg.mL⁻¹. A dispersão obtida apresentou-se turva e uniforme, indicando a possível formação de partículas. A amostra obtida foi nomeada também de E1 e, posteriormente analisada por DLS e potencial zeta.

Método E2: Visto que no método de reidratação de filme geralmente o filme é formado pelo material envoltório das partículas pensou-se em diluir 10mg de galactomanana alquilada em 10mL de água e prosseguir com a rotaevaporação desta água. Após obtenção do filme o mesmo foi ressuspenso em 10 ml de uma mistura de 50% tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹ pH 7,2 e 50% de etanol. Ao final a solução apresentava turbidez

característica de suspensões de partículas, porém apresentava grumos de galactomanana não dissolvida persistentes à agitação. Esta condição foi nomeada E2 e analisada, também, por potencial zeta e DLS.

Método E3: A fim de se garantir a completa dispersão de ambas as fases tentou-se misturar uma solução de idebenona 1mg.mL^{-1} e uma dispersão de galactomanana alquilada em tampão a 1mg.mL^{-1} . O produto foi então mantido sob agitação e posteriormente teve seu volume reduzido à metade em rotaevaporador. A solução apresentou turbidez e uniformidade a olho nu, foi nomeada E3 e analisada por DLS e potencial zeta.

Método E4: Foi formado um filme de idebenona sobre um filme polimérico pré-existente, assim, quando este filme resultante fosse reidratado com tampão a idebenona tenderia a buscar os domínios hidrofóbicos da galactomanana alquilada. Para tanto uma solução aquosa de galactomanana a 1mg.mL^{-1} em água. Foi rotaevaporada à secura, após o que uma solução etanólica de idebenona em igual concentração foi também seca sobre o filme pré-existente. Após a secagem o filme resultante foi ressuspenso em tampão fosfato $0,1\text{mol.L}^{-1}$ pH 7,2 sob agitação magnética. A solução apresentou turbidez, porém, novamente, apresentou grumos de galactomanana que sedimentavam. Esta condição foi nomeada E4 e foi, também, analisada por potencial zeta e DLS.

Tabela 2. Resumo das formulações utilizadas no encapsulamento da idebenona.

Formulação	Soluções Utilizadas	Método
E1	1ml idebenona a 10mg.mL^{-1} em etanol 10mL galactomanana alquilada a 1mg.mL^{-1} em tampão fosfato pH 7,0 0,01 mol/L	Filme de idebenona ressuspensão com galactomanana
E2	10mL idebenona a 1mg.mL^{-1} em etanol:Tampão PBS 1:1 10mL galactomanana alquilada a 1mg.mL^{-1} em tampão fosfato pH 7,0 0,01 mol/L	Filme de galactomanana ressuspensão com idebenona
E3	10mL de idebenona a 1mg.mL^{-1} em etanol 10mL galactomanana alquilada a 1mg.mL^{-1} em tampão fosfato pH 7,0 0,01mol/L	Mistura das duas soluções com volume reduzido à metade posteriormente
E4	10mL de idebenona a 1mg.mL^{-1} em etanol 10mL galactomanana alquilada a 1mg.mL^{-1} em água	Filme de idebenona sobre filme de galactomanana ressuspensos com tampão fosfato pH 7,0 0,01mol

FONTE: A autora (2020)

3.5.3 Teste de Sonicação

Após a escolha do melhor método de encapsulação foram observadas mais de uma população por DLS, assim pensou-se na sonicação das partículas obtidas a fim de se homogeneizar estas populações. Foram preparadas 4 novas amostras pelo método E1 que foram submetidas a ultrassom de sonda pelos tempos de 0, 30, 45 e 60 segundos, que foram submetidas a ultrassom (Sonics vibra cell) com sonda, com 30% de amplitude, sem aquecimento e em banho de água a temperatura ambiente após o que foram analisadas por DLS.

3.6 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas obtidas foram avaliadas quanto à eficiência de encapsulamento; ao tamanho; à morfologia; à estabilidade; à capacidade de liberar a idebenona encapsulada; e à atividade antioxidante.

3.6.1 Espalhamento de Luz Dinâmico

As análises de espalhamento de luz dinâmico foram realizadas conforme descrito no item 3.4.3 para os polímeros.

3.6.2 Microscopia de Força Atômica

As análises de microscopia de força atômica foram realizadas conforme descrito no item 3.4.4 para os polímeros.

3.6.3 Potencial Zeta

As análises de potencial zeta foram realizadas conforme o item 3.4.5 para os polímeros.

3.6.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

As análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura TESCAN VEGA 3 LMU com resolução de 3 nm e magnificação de 100kX, pressão controlada entre 3 a 500 Pa e processamento das amostras pelo software Mex da Alicona. Todas as amostras foram depositadas em filme sobre fita de cobre. Foram obtidas imagens para os polímeros nativo, oxidado, alquilado e para a amostra Ox-DDC, além das partículas obtidas pelo método otimizado. Como forma de controle o mesmo método utilizado no preparo das partículas foi repetido com os outros polímeros a fim de se confirmar se eles realmente não são capazes de formar partículas sem que estejam alquilados.

3.6.5 Eficiência de encapsulamento

A eficiência de encapsulamento foi realizada nas mesmas proporções utilizadas por Amorim *et al.* (2010) por CLAE (Item 3.3.4). Foram preparadas amostras em diferentes proporções de fármaco:polímero a partir de duas soluções estoque, uma de idebenona e uma de polímero, após o que as mesmas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min e tiveram o precipitado lavado com etanol. Este processo foi realizado a fim de quebrar as partículas e retirar o conteúdo das mesmas.

Esta solução etanólica foi, então, diluída na proporção 1:10 e injetada no cromatógrafo.

3.6.6 Avaliação da estabilidade das partículas contendo idebenona

As suspensões de nanopartículas foram mantidas durante 4 semanas sob duas condições diferentes: sob refrigeração a 5 °C (condição 1) e exposta a variações de temperatura (condição 2; amplitude térmica de 15 a 26 °C para o período; Fonte: SIMEPAR) e tiveram seu potencial antioxidante avaliado semanalmente contra uma solução de idebenona 1mg.mL⁻¹ em etanol mantida nas mesmas condições. Os recipientes contendo todas as soluções foram protegidos da luz envoltos em papel alumínio.

3.6.7 Cinética de liberação do Fármaco

A capacidade de liberação foi realizada por diálise por membrana de éster de celulose conforme Amorim *et al.* (2010). Foi utilizada quantidade de partículas suficiente para 1,25 mg de idebenona suspensas em 50ml de água; a 37 °C sob agitação constante. Durante a análise foram retiradas alíquotas do meio após 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12 e 24 h em que foram analisadas a quantidade de idebenona liberada e, ao fim, a quantidade de idebenona retida nas partículas restantes no saco de diálise. Como meio receptor foram testados Tween 20 a 5% em água conforme Amorim *et al.* (2010), etanol a 30% em água conforme Brendle (2013), e etanol a 50% em água como meio capaz de solubilizar completamente a idebenona.

3.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A fim de se avaliar a aplicabilidade do sistema desenvolvido a atividade antioxidante foi analisada para a idebenona encapsulada e para a idebenona pura. Os ensaios foram realizados com uma solução alcoólica de idebenona a 1mg.mL⁻¹ e uma suspensão de partículas preparadas utilizando-se a proporção polímero:fármaco 1:0,5. Quantidade suficiente destas soluções foram preparadas a fim de que a estabilidade da idebenona pudesse ser avaliada semanalmente em 2 condições de acondicionamento diferentes durante 4 semanas. As condições avaliadas foram: dentro de geladeira e exposta às variações de temperatura, conforme item 3.6.6.

Tais ensaios foram realizados por dois métodos, sendo um preparado em meio alcoólico e outro em meio aquoso, fator importante, visto que a idebenona apresenta pouca solubilidade em água. Os ensaios de determinação da atividade antioxidante foram utilizados na análise da estabilidade do sistema, a fim de se determinar se o encapsulamento da idebenona interfere na preservação da atividade antioxidante do fármaco. Os controles foram realizados com nanopartículas dos polímeros alquilados sem idebenona.

3.7.1 Ensaio do Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)

O ensaio foi adaptado de Thaipong *et al.* (2006). A solução estoque de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) foi feita em metanol à concentração de 24 mg.mL⁻¹ e acondicionada a 0 °C. A solução de trabalho foi obtida através da dissolução de 1mL da solução estoque em 9mL de etanol a fim de obter a absorbância de 1±0,02 unidades quando lida a 515 nm no espectrômetro. 1mL de solução de idebenona ou de suspensão de partículas foi, então, misturado a 500µL de solução de DPPH e deixados no escuro por 16h, definido como o tempo necessário para que o DPPH apresentasse mudança de cor frente a uma solução de idebenona recém preparada e não houvesse alteração da cor em função do tempo, caracterizando, assim, a completa redução do radical. Decorrido o tempo da reação a absorbância a 515nm foi medida e a porcentagem de inibição calculada como descrito acima.

3.7.2 Ensaio do Radical ácido'2,2'-azino-bis(3-ethylbenzotiazolino-6-sulfonico) (ABTS)

O ensaio também foi adaptado de Thaipong *et al.* (2006). Foram preparadas duas soluções estoque: uma de ABTS (ácido'2,2'-azino-bis(3-ethylbenzotiazolino-6-sulfonico)) a 7,4mmol.L⁻¹ e uma de persulfato de potássio a 2,6 mmol.L⁻¹. A solução de trabalho foi preparada pela mistura das duas soluções estoque em quantidades iguais com posterior repouso da solução resultante por 16h no escuro. 1mL da solução de trabalho foi, então, diluído em 10mL de água a fim de se obter uma absorbância de 1±0,02 unidades quando lida a 734 nm no espectrômetro. 500µL dessa solução foram adicionados a 1mL de solução de idebenona ou suspensão de partículas e mantidos no escuro por mais 16 h, definido como o tempo necessário para que o ABTS apresentasse mudança de cor frente a uma solução de idebenona recém preparada

e não houvesse alteração da cor em função do tempo. Decorrido o tempo de reação a solução foi lida a 734nm e a porcentagem de inibição calculada como descrito acima.

Os resultados para ambos os testes realizados foram expressos como a razão da porcentagem de inibição obtida para a suspensão de partículas sobre a porcentagem de inibição obtida para a solução de idebenona. Sendo a porcentagem de inibição calculada pela razão da absorbância obtida pelo reagente (A_r) subtraída da absorbância da amostra (A_a) pela absorbância do reagente vezes 100.

$$\%_I = \left(\frac{A_r - A_a}{A_r} \right) * 100 \quad (\text{Eq 2})$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, a idebenona adquirida foi caracterizada pela técnica de ATR-FTIR (item 3.3.1), a fim de garantir que o material adquirido pudesse ser classificado com idebenona. Após a execução destes dois experimentos a mesma foi injetada em cromatógrafo de alta eficiência (item 3.3.4) e teve seu espectro comparado a padrão analítico, a fim de se pesquisar possíveis produtos de degradação. Após a caracterização da idebenona a galactomanana nativa foi, também, caracterizada por RMN ^1H (item 3.3.2) e SEC (item 3.3.3), a fim de se atestar a eficiência de sua purificação, além dos polímeros oxidado e alquilado, para se confirmar a ocorrência de enxertia na cadeia polimérica. Além do que a capacidade de auto associação dos polímeros modificados foi atestada pelas técnicas de tensiometria (item 3.4.1), potencial zeta (item 3.4.5) e fluorimetria com sonda de pireno (item 3.4.2).

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA IDEBENONA

Inicialmente a solubilidade da idebenona adquirida foi determinada com base nos parâmetros descritos na 6ª edição da Farmacopéia Brasileira (ANVISA, 2010). Assim, porções de 10mg de idebenona foram testadas em etanol e em água, apresentando-se, assim, muito solúvel em etanol (menos de 1 parte de solvente é necessário para solubilizar a amostra) e muito pouco solúvel em água (de 1000 a 10000 partes de solventes necessárias para cada parte de amostra).

4.1.1 Caracterização da Idebenona por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

O espectro obtido para a idebenona adquirida (figura 6) foi comparado com os dados obtidos por Cannava *et al.* (2013), conforme a Tabela 3. O espectro apresenta deslocamento correspondente ao estiramento de O-H em 3.571cm^{-1} decorrente da hidroxila presente na ponta da cadeia alquílica, ainda sobre esta hidroxila apresenta o deslocamento em 1.380cm^{-1} decorrente de sua deformação angular. Apresenta, também deslocamentos em 2.929 e 2.841cm^{-1} correspondentes aos estiramentos de C-H, além dos deslocamentos decorrentes do C=O da carbonila e da C=C do anel hidroquinona em 1.644 e 1.606cm^{-1} respectivamente. Apresenta, ainda os estiramentos da ligação C-C (1.500 a 1.000 cm^{-1}), CH_2 (1.463 e 1.432 cm^{-1}), C-H e C-O (900 a 7.500 e 1.270 a 1.000 cm^{-1}).

Figura 6. Espectro de infravermelho obtido para a idebenona com seus assinalamentos químicos mais relevantes destacados.

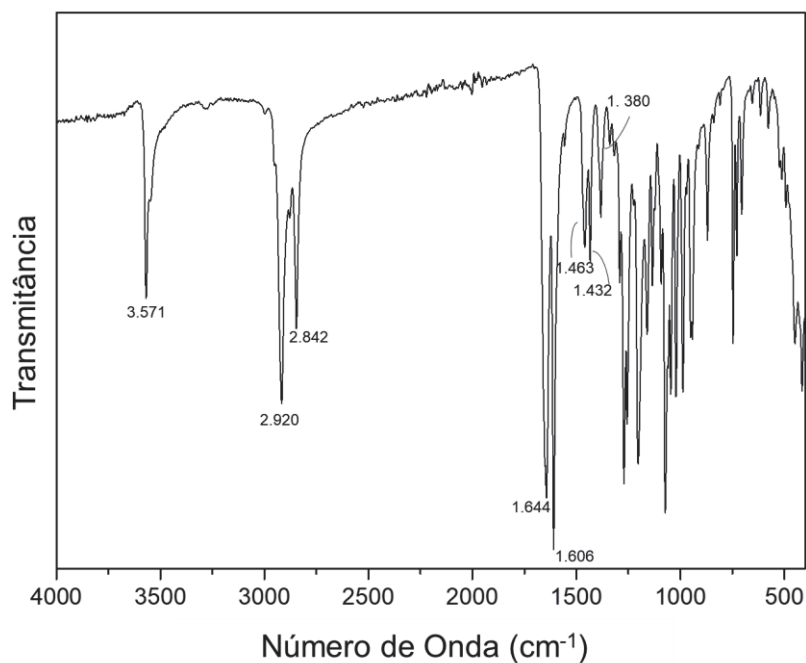


Tabela 3. Deslocamentos químicos e suas respectivas deformações presentes no espectro de infravermelho da idebenona.

Número de Onda (cm ⁻¹)	Atribuição
3.500	estiramento O–H;
2.920 e 2.842	estiramento C–H;
1.644 e 1.606	estiramentos C=O da carbonila e C=C do anel;
1.500 a 1.000	estiramentos C–C ;
1.463 e 1.432	deformações angulares CH ₂ da cadeia alquílica;
1.380	deformação angular no plano de OH;
1.270 a 1.000	deformação angular no plano do CH do anel juntamente com estiramento do C–O;
900 a 7.500	deformação angular fora de plano de C–H.

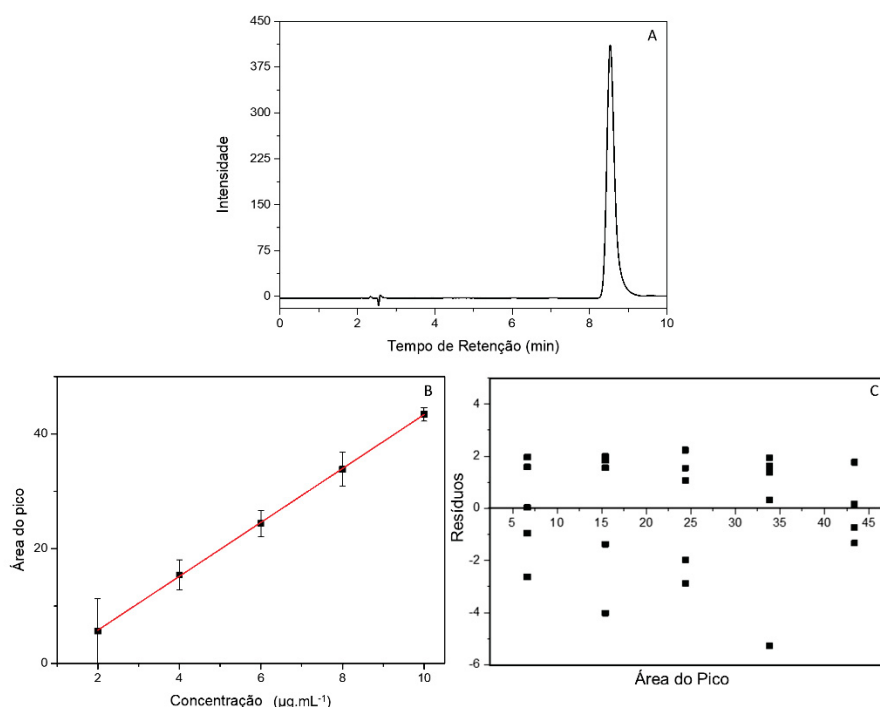
FONTE: A autora (2020)

4.1.2 Quantificação da Idebenona por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para a quantificação da idebenona foi utilizada a técnica descrita por Amorim (2010). A idebenona apresentou tempo de retenção de 9 min, valor próximo ao encontrado por Amorim (2009) de 8 min. Além de apresentar um pico único e bem definido (figura 7 A). Foi analisada uma solução de idebenona a 10µg.mL⁻¹ para a avaliação da pureza da idebenona. O valor de pureza obtida foi de aproximadamente 78% e este valor foi considerado no cálculo dos próximos experimentos, sem o aparecimento de picos de impureza neste comprimento de onda.

A curva padrão obtida (figura 7 B) foi utilizada no cálculo dos limites de detecção e quantificação. O coeficiente de correlação encontrado foi de 0,9998, indicando boa correlação entre os valores e os limites obtidos foram de 2µg.mL⁻¹ para o limite de detecção (LD) e 6µg.mL⁻¹ para o limite de quantificação (LQ). A equação da reta obtida foi: Área do Pico/mV.s=4,697x[Idebenona/ug.mL⁻¹]-3,605 (R²=0,99985). Foi ainda plotado o gráfico de resíduos da curva analítica (figura 7 C) onde se pode observar que as replicatas da curva não apresentaram grande dispersão, indicando a aplicabilidade da curva, apesar de seus altos limites de quantificação e detecção.

Figura 7. Perfil de eluição da idebenona por CLAE (A) e curva de calibração utilizada na quantificação da idebenona realizada em concentrações entre 2 e 10 µg.mL⁻¹(B) com fase móvel composta por metanol a 80% em água, coluna Symmetry C18, a 30 °C.



FONTE: A autora (2020)

4.2 OTIMIZAÇÃO DA REAÇÃO DE OXIDAÇÃO

A reação de oxidação foi realizada em diferentes condições, sendo a primeira condição em que a quantidade de reagentes TEMPO foi calculada estequiometricamente para a oxidação de 10% da galactomanana utilizada, ou seja, $8,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ e a quantidade de NaClO foi mantida conforme Sierakowski *et al.* (2000) em $1,25 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. Como esta reação teve suas condições mais bem rastreadas a mesma foi chamada de Condição 1. A quantidade de NaOH adicionada ao meio reacional foi anotada em relação ao tempo de reação decorrido e, a partir da equação abaixo (equação 1) estes dados de volume foram convertidos em mmol de ácido carboxílico por g de polissacarídeo, assim o gráfico abaixo (figura 8) foi obtido para todas as condições reacionais.

$$[-COOH] = \frac{V.M}{m} \quad (\text{Eq. 1})$$

Sendo: V volume de hidróxido utilizado em mL; M Molaridade do hidróxido em mol.L⁻¹; m massa de galactomanana utilizada em g.

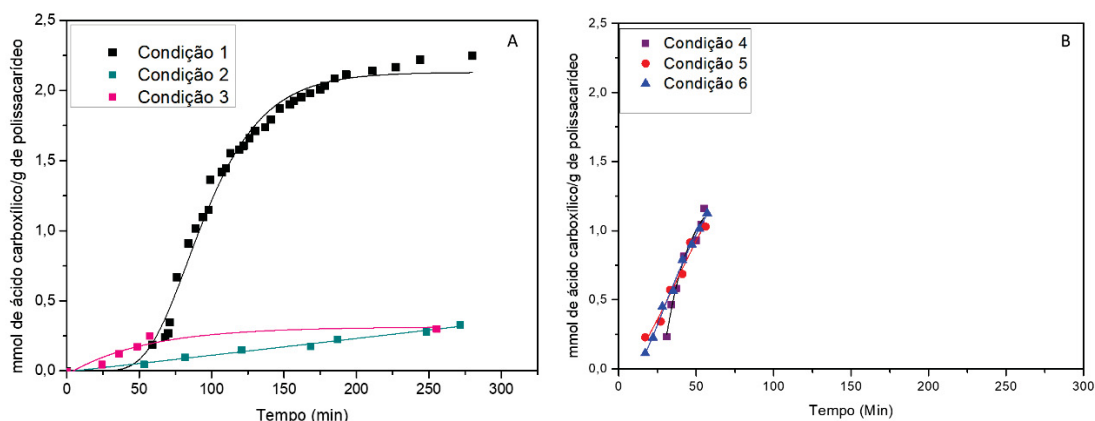
A condição 1 formou, ao total, 2,24mmol de ácido por grama de polissacarídeo e, como pode ser observado na figura 8 (A), a reação tende a estacionar próximo de 170 min. Pode se observar também que a reação se inicia lentamente a partir de aproximadamente 60 min. Isto pode ser devido à baixa taxa de solubilização do reagente TEMPO nas condições reacionais utilizadas. A fim de reduzir este efeito todos os reagentes foram previamente solubilizados em pequena quantidade de água purificada.

A fim de reduzir a quantidade de ácido carboxílico formada propôs-se a alteração da quantidade de oxidante secundário (NaClO) em relação à quantidade de TEMPO para a menor quantidade necessária para a elevação do pH do meio acima de 9,3. Assim a quantidade de TEMPO foi mantida e a quantidade de NaClO foi ajustada para 1,67.10⁻¹mol.L⁻¹. Com esta modificação realmente houve diminuição na quantidade de ácido formada para 0,32 mmol de ácido por grama de polissacarídeo, porém, como pode ser observada na figura 8 (A), a reação não tende a estacionar após 300 min de reação, dando a impressão de que a reação ainda não atingiu seu ponto final. Esta condição foi nomeada condição 2.

Finalmente, em uma tentativa de forçar a formação de um platô no perfil da reação a quantidade de TEMPO foi dobrada para 1,66.10⁻⁴ mol.L⁻¹, visto que o mesmo apresenta dupla função na reação, a de oxidar seletivamente o álcool primário e evitar, assim, a despolimerização da galactomanana. Esta condição produziu 0,32 mmol de ácido por grama de polissacarídeo e foi nomeada condição 3. Como pode ser observado no gráfico esta condição apresentou um perfil de pseudo-primeira ordem, estacionando após cerca de 1 h.

Todas as reações foram acompanhadas durante 5h e tiveram alíquotas retiradas e analisadas de h em h.

Figura 8. Determinação da quantidade de grupos carboxílicos formados na reação de oxidação da galactomanana com o catalizador TEMPO, realizados a 3 °C, usando água como solvente. A concentração de galactomanana foi de 1mg.mL⁻¹, a concentração do NaOH utilizado foi 0,05mol.L⁻¹

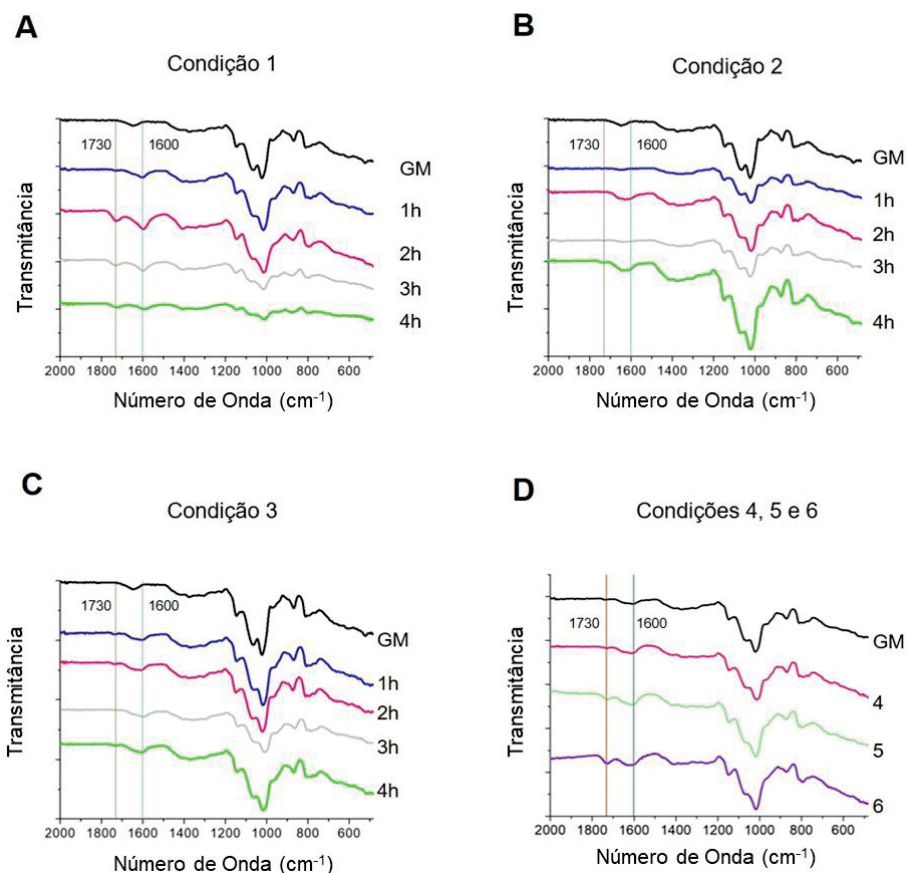


FONTE: A autora (2020)

Outro artifício utilizado para o controle das reações de oxidação foi o infravermelho (figura 9). Nele as bandas de 1600 e 1730 nm⁻¹, aldeído e ácido carboxílico respectivamente, foram monitoradas a fim de se observar um aumento na banda de aldeído sem aumento aparente na banda correspondente ao ácido carboxílico.

Para a primeira condição pode se notar um aumento da banda correspondente ao estiramento de C=O de ácidos carboxílicos em 2h em relação à banda correspondente a aldeídos, indicando que uma grande quantidade de grupamentos ácidos foi formada nesta condição. Com relação à condição 2, nenhum dos estiramentos desejáveis apresenta-se em quantidades mensuráveis, indicando a não formação ou formação não mensurável dos grupamentos aldeído e ácido carboxílico. Na condição 3 há formação de grupamentos aldeído já na primeira hora, e a quantidade de grupos carboxílicos se mantém constante em função do tempo de reação. Esta formação de aldeídos já na primeira hora, juntamente com o estacionamento da reação possibilitou que nas próximas etapas de otimização fosse adotado 1 h para as reações. A fim de aumentar a quantidade de grupos aldeídos formados, foram realizados, utilizando a razão TEMPO/OCl⁻, outras reações, denominadas de condições 4,5 e 6, em que a concentração de ambos, oxidantes primários e secundários foram aumentadas.

Figura 9. Espectros de FTIR da galactomanana nativa e de seus produtos após oxidação nas condições 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4, 5 e 6 (D). As amostras 4,5 e 6 foram avaliadas apenas ao final da reação, 1 h.



Legenda: (GM) galactomanana nativa, (1h,2h,3h e 4h) alíquotas retiradas nestes tempos de reação, (4,5 e 6) condições otimizadas na oxidação.

FONTE: A autora (2020)

Para as condições 4, 5 e 6 as quantidades de reagentes utilizados na condição 3 foram proporcionalmente multiplicadas por 2 (condição 4), 4 (condição 5) e 8 (condição 6), porém mantendo-se a mesma razão entre o TEMPO e o oxidante secundário hipoclorito de sódio, a fim de se aumentar a quantidade de aldeídos formados, em relação à condição 3. Os dados obtidos para a titulação dos grupamentos ácido carboxílico gerados encontram-se na figura 8 (B).

Todas as reações apresentaram perfis semelhantes aos observados para a condição 3 e, portanto, foram conduzidas durante uma hora, tempo suficiente para que o perfil da condição 3 apresentasse uma estabilização na formação de grupamentos ácidos. Estes dados corroboram com os encontrados na titulação dos grupamentos ácidos formados, visto que o gráfico representado na figura 8 (A) também apresenta uma estabilização na velocidade de reação após 1 h de reação. Porém, quando analisados em FTIR pode-se observar que a condição 6 apresentou

maior formação de grupamentos aldeído, bem como de grupamentos ácido, porém os grupamentos ácidos formados não se apresentam em quantidades suficientes para interferir negativamente na próxima etapa de aminação redutiva. Assim a condição 6 foi a escolhida para prosseguir para a etapa de alquilação e foi renomeada para Ox.

Tabela 4 Otimização da reação de oxidação da galactomanana com TEMPO para a formação do derivado de galactomanana com maior teor de grupos com aldeído em C-6.

Condição	Tempo (h)	TEMPO (mmol.L ⁻¹)	NaClO (mmol.L ⁻¹)	TEMPO/NaClO	-COOH/ g de polímero (mmol.g ⁻¹)
1	1	0,083	12,5	6,64x10 ⁻³	0,19
	2	0,083	12,5	6,64x10 ⁻³	1,58
	3	0,083	12,5	6,64x10 ⁻³	2,03
	4	0,083	12,5	6,64x10 ⁻³	2,17
2	1	0,083	9,4	8,83x10 ⁻³	0,05
	2	0,083	9,4	8,83x10 ⁻³	0,11
	3	0,083	9,4	8,83x10 ⁻³	0,19
	4	0,083	9,4	8,83x10 ⁻³	0,24
3	1	0,166	9,4	1,77x10 ⁻²	0,19
	2	0,166	9,4	1,77x10 ⁻²	0,27
	3	0,166	9,4	1,77x10 ⁻²	0,27
	4	0,166	9,4	1,77x10 ⁻²	0,32
4	1	0,332	18,7	1,77x10 ⁻²	0,93
5	1	0,664	37,9	1,76x10 ⁻²	1,03
6	1	1,328	74,8	1,77x10 ⁻²	1,13

^a Em relação ao material inicial utilizado na reação.

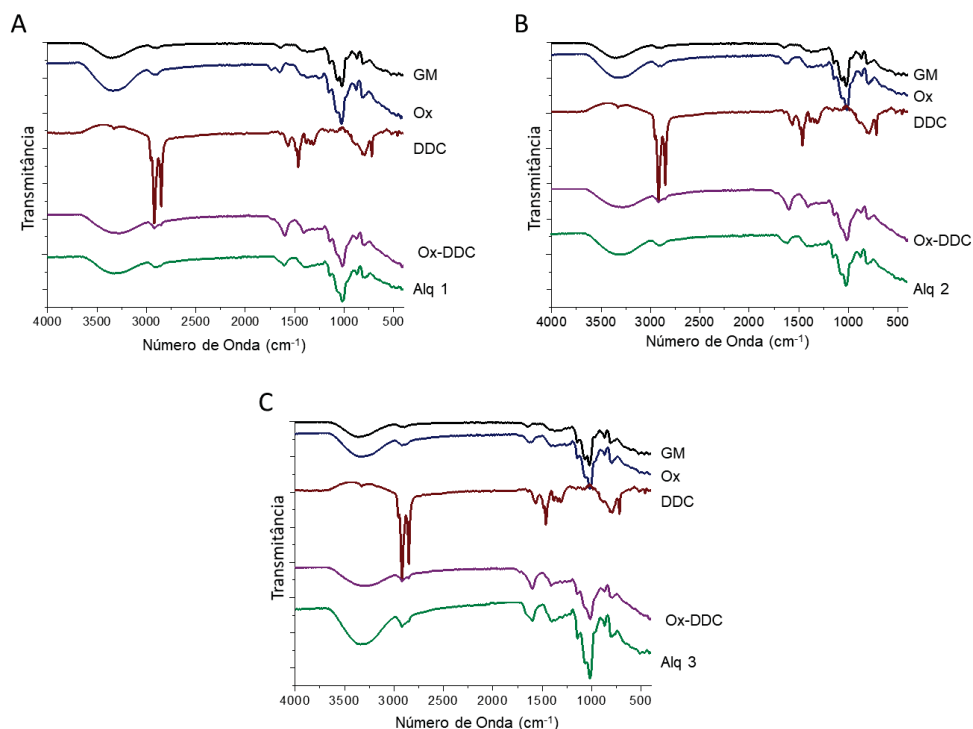
FONTE: A autora (2020)

4.3 OTIMIZAÇÃO DA REAÇÃO DE ENXERTIA DA CADEIA POLIMÉRICA

Como pode ser observado na figura 10 (A) o espectro de infravermelho apresentou deslocamento da banda em 1625 cm^{-1} de Ox para 1608 cm^{-1} em Alq1 correspondente à deformação angular do N-H de aminas. O espectro de alq demonstrou, ainda o aparecimento de banda em 1406 cm^{-1} que pode corresponder à vibração angular do grupamento CH_3 da dodecilamina. A aparência destas bandas, bem como a ausência das mesmas na amostra Ox-DDC indica que a alquilação da galactomanana ocorreu, porém, não elimina a possibilidade de que parte das cadeias de dodecilamina esteja interagindo eletrostaticamente.

Para a amostra Alq2 (figura 10 B), pelo espectro de FTIR, se mantém o mesmo em relação à figura 10 (A), mas este meio mais ácido foi escolhido para ser utilizado nas próximas reações. Finalmente, pode ser observado no espectro de Alq3 um aumento da banda em 1608 cm^{-1} indicando uma maior alquilação por esta condição. Esta condição foi, então, escolhida para se prosseguir os experimentos e foi nomeada apenas de Alq.

Figura 10. Espectros de FTIR da galactomanana nativa e de seus produtos após oxidação/alquilação nas condições Alq1 (A), Alq2 (B) e Alq3 (C).



Legenda: (GM) galactomanana nativa, (Ox) galactomanana oxidada, (DDC) dodecilamina, (Ox-DDC) galactomanana oxidada interagindo com dodecilamina, (Alq) galactomanana alquilada.

FONTE: A autora (2020)

4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS

4.4.1 Ressonância Magnética Nuclear

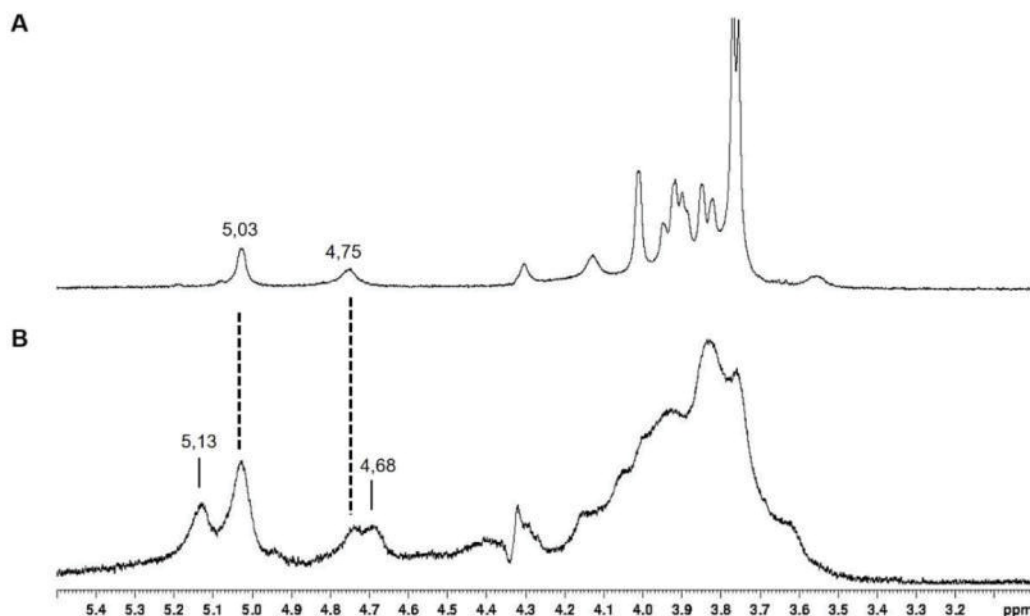
Os assinalamentos para a galactomanana nativa foram identificados de acordo com Cunha *et al.* (2009) e Ganter *et al.* (1995). O espectro exibe dois sinais iniciais em 5,04 e 4,73 ppm correspondentes às regiões anoméricas da galactose e da manose, respectivamente. A partir destes sinais pode ser obtida a razão galactose:manose de 1:1,26. Os Demais assinalamentos encontram-se na tabela 5.

Com relação à galactomanana oxidada (figura 9) a mesma apresentou sinais na região de 5,13 e 4,68 ppm. Não foi identificado, porém sinal em 3,57 ppm correspondente ao H5 das unidades de manose não substituídas, o que sugere a total oxidação destas unidades.

Tabela 6 Assinalamentos obtidos pela técnica de RMN para os hidrogênios das unidades sacarídicas de α -D-Galactose, β -D-Manose e β -D-Manose substituída

Unidade	H1	H2	H3	H4	H5	H6
α -D- Galactose	5,03	3,83	3,92	4,00	3,88	3,79
β -D-Manose	4,75	4,13	3,77	3,91	3,57	3,84
β -D-Manose substituída	4,75	4,13	3,77	3,91	3,76	3,93

Figura 9. Espectro de RMN obtido para a galactomanana nativa (A) e oxidada pela condição 6

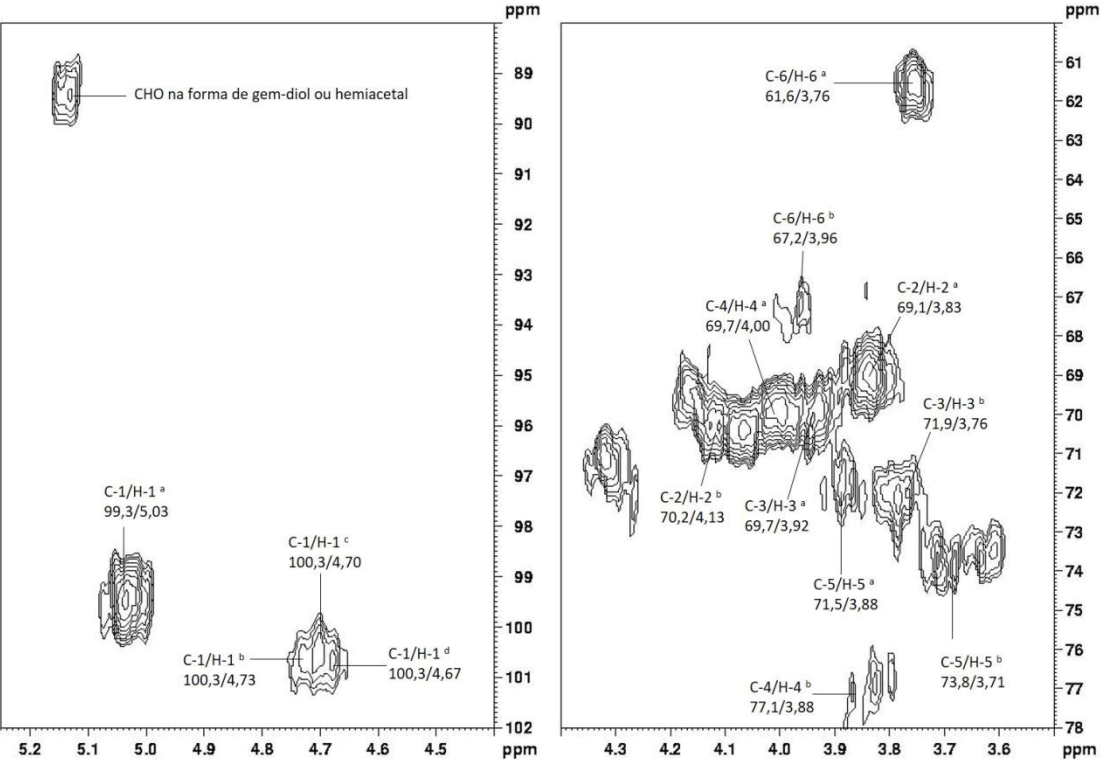


NOTA: Solvente = D₂O. Temperatura = 70 °C. Calibrado com acetona em 4,75 ppm

Na região do anel do espectro de HSQC-editado, foram assinaladas as correlações referentes aos C-2/H-6 das unidades de α -D-Gal e a β -D-Man-4-ligada 6-substituída. No espectro de RMN de ¹H, não foi identificado o sinal em 3,57 ppm, correspondente ao H-5 das unidades de manose não substituídas, sugerindo que 100% destas unidades foram convertidas em ácido manurônico ou manose-6-aldeído. O C-2/H-2 e o C-3/H-3 destas unidades foram assinalados em 70,2/4,06 e 71,9-72,1/3,77-3,80 ppm, respectivamente (CRESCENZI *et al.*, 2004). No entanto, devido

à sobreposição e a complexidade dos espectros de ^1H e HSQC-editado, as correlações de C-4/H-4 e C-5/H-5 destas novas unidades não puderam ser assinaladas. Também devido à sobreposição dos sinais, não foi possível quantificar o teor de ácido manurônico e de manose 6-aldeído formados.

Figura 10. Espectro de RMN de HSQC da fração Ox.



NOTA: Solvente = D₂O. Temperatura = 70 °C. Calibrado com acetona em 2,225 ppm.

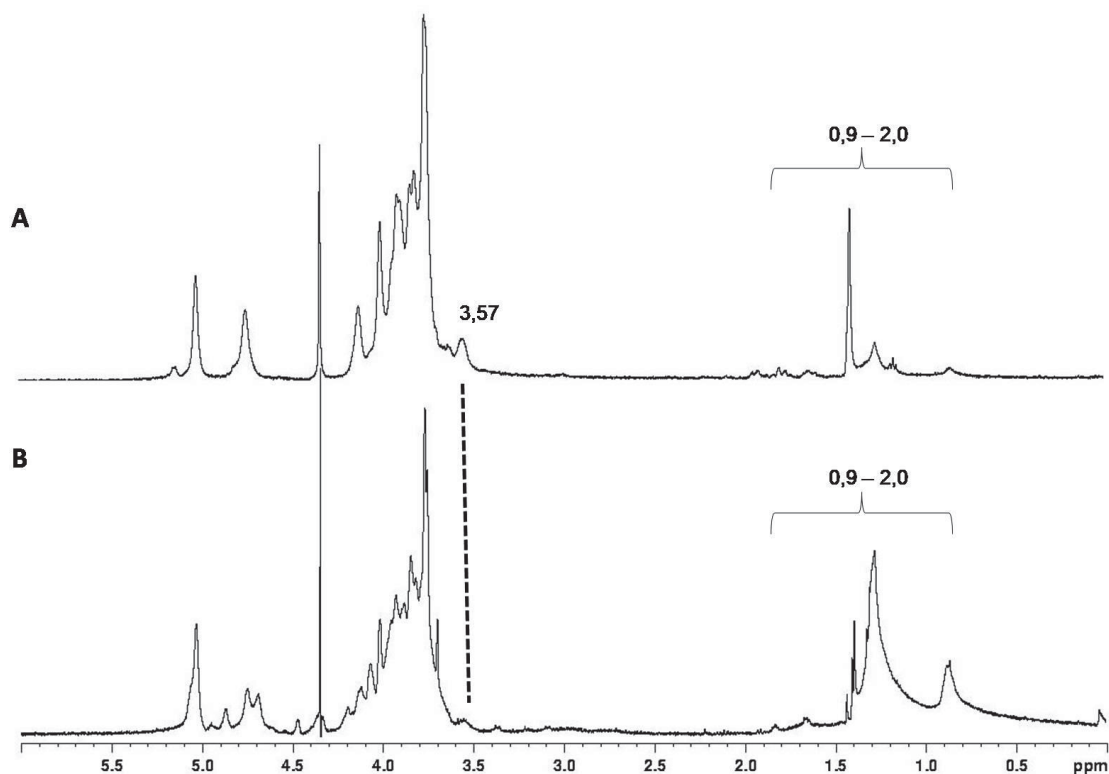
Tabela 5 Assinalamentos de RMN de HSQC-editado da fração Ox

C/H	α- D – β-D-Manp 4-ligada	β-D-Manp 4-ligada	β -D-Manp 4-ligada
	Galp	6-substituída	COO ⁻
			ligada CHO
C-1/H-1	99,3/5,03	100,3/4,73	100,3/4,70
C-2/H-2	69,1/3,83	70,2/4,13	70,2/4,06
C-3/H-3	69,7/3,92	71,9/3,76	72,1-71,9/3,77-3,80
C-4/H-4	69,7/4,00	77,1/3,88	-
C-5/H-5	71,5/3,88	73,8/3,71	-
C-6/H-6	61,6/3,76	67,2/3,96	-
			89,5/5,13

- = não assinalado

Com relação à galactomanana alquilada a mesma apresentou um novo sinal em 4,86 ppm em relação às frações oxidada e Ox-DDC (figura 11), assim, acredita-se que este sinal corresponda a unidades de manose ligadas a grupamento alquil. Além dos sinais relativos a galactomanana os espectros da goma alquilada bem como o espectro de ox-DDC apresentaram sinais entre 0,9 e 2 ppm advindos da dodecilamina, mas, apesar de estarem presentes nas duas amostras estes sinais são mais proeminentes na amostra alquilada em relação à ox-DDC. Esta informação corrobora com o sinal de H5 que, inicialmente, havia sumido no polímero oxidado mas torna a aparecer na fração Ox-DDC indicando sua possível redução, além de estar aparente na amostra alquilada, porém em menor intensidade sugerindo a inserção da cadeia alquílica nas unidades de manose. Isto posto, pode-se dizer que a reação de alquilação ocorreu, porém, como não foi identificado o sinal do hidrogênio ligado ao carbono da amina pode-se dizer que a alquilação ocorreu em um grau muito baixo.

Figura 11. Espectro de RMN de ^1H das frações Ox-D e Alq.

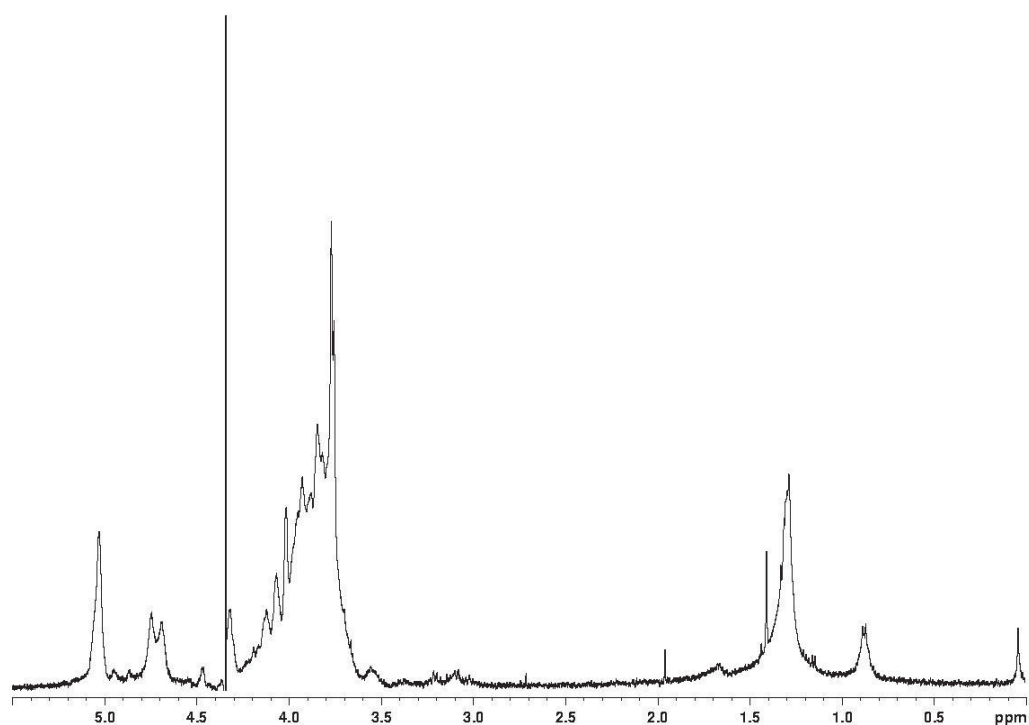


NOTA: Solvente = D_2O . Temperatura = 70°C . Calibrado com acetona em 4,75 ppm.

A fim de remover a dodecilamina que possa estar interagindo eletrostaticamente, a amostra Alq foi lavada com etanol, visto que este solvente tem

a capacidade de dissolver a dodecilamina e não a galactomanana. O seu espectro de RMN (figura 12) indica a presença de dodecilamina mesmo após esta lavagem indicando que a alquilação de fato ocorreu. Porém, devido à sobreposição do espectro e o grau de substituição provavelmente baixo, não foi possível quantificá-lo.

Figura 12. Espectro de RMN de ^1H das frações Ox-D e Alq



NOTA: Solvente = D_2O . Temperatura = 70°C . Calibrado com acetona em 4,75 ppm.

4.4.2 Cromatografia de Exclusão por Tamanho

Para a determinação do valor de dn/dc para a galactomanana a variação do índice de refração em função das concentrações do polissacarídeo foi avaliada. O valor obtido foi de $0,139 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ e foi utilizado no cálculo da massa molar média ponderal (M_w) e numérica (M_n).

Para o polímero nativo foram encontradas M_w e M_n de $6,8 \times 10^5 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ e $7,2 \times 10^5 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, respectivamente. Estes valores estão em concordância com os encontrados por Lubambo *et al.* (2013) e Seixas (2019) que trabalharam com o mesmo polissacarídeo. Com relação ao polímero oxidado as massas encontradas foram de $1,6 \times 10^5 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ e $2,6 \times 10^5 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ respectivamente, levemente superiores às encontradas por Seixas (2019) e Sakakibara *et al.* (2016), provavelmente devido ao

fato das condições oxidantes utilizadas no presente trabalho serem mais brandas, induzindo, portanto, uma menor despolimerização da galactomanana. Com relação ao polímero alquilado, as massas encontradas foram $1,5 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ e $2,4 \cdot 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ respectivamente. As análises de SEC também foram realizadas para a amostra Ox-DDC que não apresentou diferença em relação a amostra oxidada.

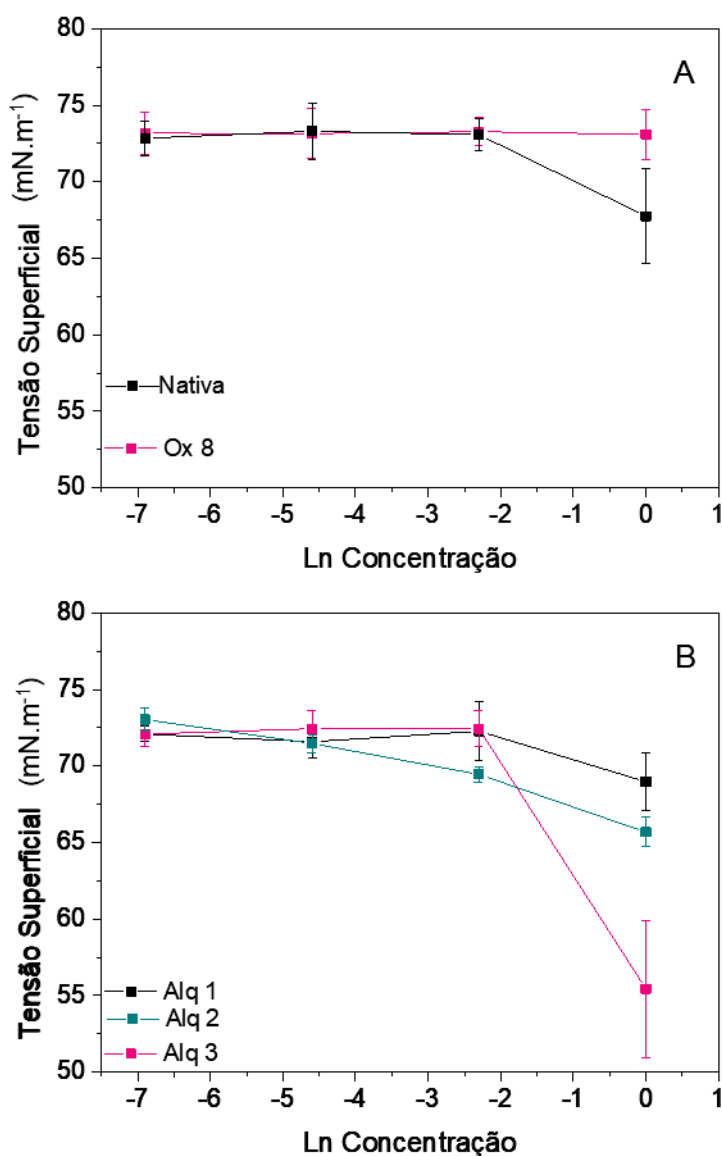
4.4.3 Determinação da Tensão Superficial

Após a alquilação da galactomanana esperava-se que a mesma apresentasse a capacidade de reduzir a tensão superficial da água, devido ao seu caráter anfifílico gerado pelos grupos polares, hidroxilas das unidades do carboidrato, bem como pelos enxertos hidrofóbicos na cadeia polimérica, atuando como um agente tensoativo ou surfactante.

Os polímeros oxidados nas condições 5 e 6, bem como todos os polímeros alquilados foram testados quanto a sua capacidade de reduzir a tensão superficial da água em relação à sua concentração. Inicialmente uma solução estoque a 10 mg.mL^{-1} foi preparada e diluída em escala logarítmica (0,001; 0,01; 0,1 e 1 mg.mL^{-1}). Os resultados obtidos para todas as frações nestas concentrações encontram-se na figura 13.

A fim de compreender se a tensão superficial não era reduzida meramente pela formação de agregados poliméricos, associados à presença de uma elevada concentração polimérica, foram realizados testes com suspensões a 1 mg.mL^{-1} pesadas no momento da análise e não foram observadas diferenças estatísticas entre as duas formas de preparo.

Figura 13. Determinação da tensão superficial para as galactomananas nativa e oxidada pelas condições Ox 2 e Ox8 (A); a alquiladas pelas condições Alq1(D), Alq2 (E) e Alq3 (F)



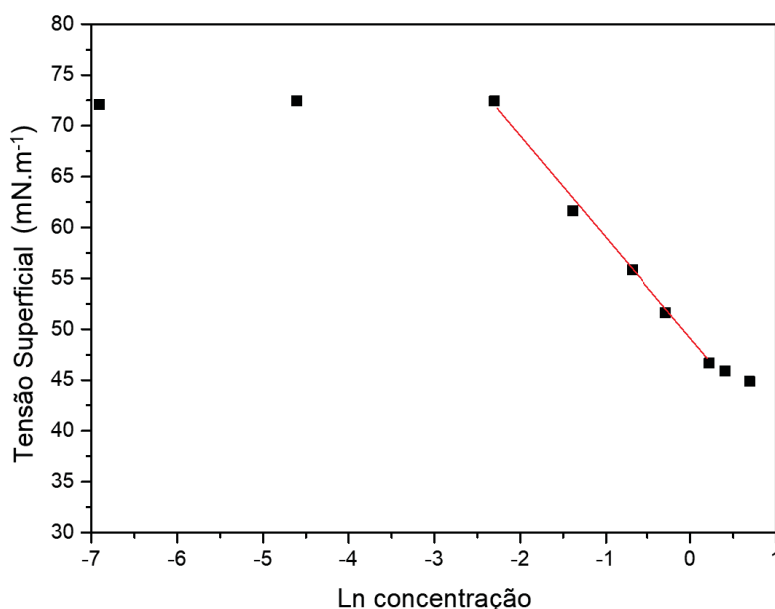
FONTE: A autora (2020)

Como pode ser observado nos gráficos acima as galactomananas oxidadas tendem a causar uma redução na tensão superficial, porém tal diminuição não é significativa quando comparada à causada pela adição da galactomanana alquilada. Cogitou-se que esta redução pudesse ser devido a algum resíduo do reagente TEMPO ligado ao polímero, então as análises foram feitas com uma solução do reagente, mas não foi observada nenhuma alteração da tensão superficial das mesmas.

Pensou-se, também, que a galactomanana alquilada tivesse meramente adsorvido a dodecilamina, assim a redução da tensão superficial seria causada apenas pela dodecilamina e não pela galactomanana, assim o polímero alquilado foi submetido à lavagens consecutivas com etanol 96% (v/v) a fim de que o mesmo dissolvesse a dodecilamina sem suspender a galactomanana, porém não foram encontradas diferenças significativas entre o polímero lavado com etanol e não lavado, à concentração de 1mg.mL^{-1} , sugerindo que a propriedade tensoativa não está relacionada puramente à dodecilamina adsorvida na galactomanana. Além disso as análises foram feitas com a amostra Ox-DDC que não apresentou diferença da tensão superficial quando comparada à amostra apenas oxidada.

Como os resultados mais importantes de redução da tensão superficial foram observados para a amostra Alquilada 3 (Alq3), as próximas análises foram realizadas apenas com este material. Um isoterma de adsorção à 25°C foi realizada, e parâmetros como a concentração micelar crítica (CMC), excesso superficial (Γ) e área (A) do surfactante foram determinados.

Figura 14. Isoterma de adsorção da galactomanana Alquilada (Alq3) em função da concentração a uma temperatura de 25°C



FONTE: A autora (2020)

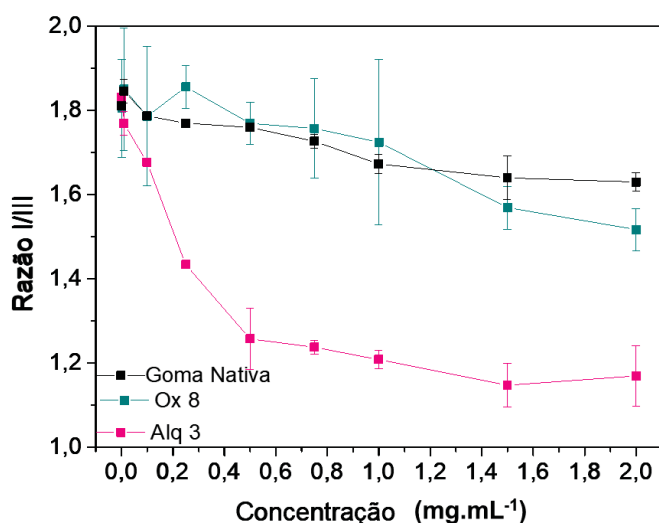
Como pode ser observado na figura 14 existem duas regiões lineares bem distintas a partir das quais podem ser obtidas duas equações da reta. Estas duas equações foram, então, igualadas a fim de se obter o valor da concentração micelar crítica para a galactomanana alquilada que foi de aproximadamente 1,1 mg.mL⁻¹. Sendo esta a concentração a partir da qual toda a superfície da gota está saturada e, supostamente, as micelas poliméricas passam a se organizar no seio da dispersão em estudo.

O excesso superficial (Γ) determinado pela equação Tensão Superficial/mN.m⁻¹=10,07x10⁻³lnC+48,67 foi de 2,0 x10⁻⁶ mol/m² e a área ocupada pelo polímero alquilado na interface foi de 0,82 nm². Seixas (2019) encontrou valores de área superficial de 1,61 nm² para a galactomanana em sua concentração de agregação crítica com o dodecil sulfato de sódio, indicando que, na atual condição a galactomanana alquilada pode estar assumindo conformação mais compacta que a observada por Seixas (2019).

4.4.4 Fluorimetria com Sonda de Pireno

A partir do cálculo da razão da intensidade da banda I pela III do espectro do pireno foram obtidos os gráficos representados na figura 15 de razão por concentração da amostra.

Figura 15. Gráficos da razão entre as intensidades das bandas I/III pela concentração de galactomanana, galactomanana oxidada (Ox 8) e galactomanana alquilada (Alq 4).



FONTE: A autora (2020)

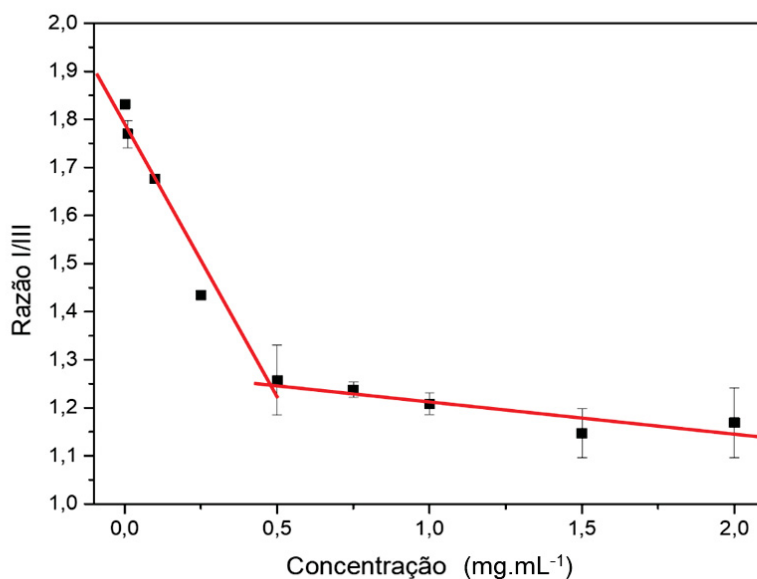
Para a galactomanana alquilada o mesmo procedimento de cálculo da CMC utilizado na tensiometria foi aplicado, gerando o gráfico representado na figura 16. A partir da extrapolação das retas obtidas foi calculada uma CMC de cerca de $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$, ou seja, a partir desta concentração o polímero alquilado passa a se organizar produzindo domínios hidrofóbicos em solução, mesmo que a interface com o ar ainda não esteja completamente saturada, conforme descrito para os experimentos de tensiometria ($1,1 \text{ mg.mL}^{-1}$).

Os dados da sonda de pireno indicam a formação de domínios hidrofóbicos na dispersão coloidal em concentrações menores àquelas em que ocorre real redução da tensão superficial, indicando que o polímero tende a formar agregados e, possivelmente, estes agregados estão migrando para a superfície da gota reduzindo, assim, a tensão superficial. De posse destes dois resultados optou-se por utilizar as concentrações de $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ como concentração próxima à CMC e $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ como abaixo da CMC.

Analisando-se as amostras de polímero nativo, oxidado e alquilado nas concentrações de $0,1$ e 1 mg.mL^{-1} , dispersos em água, observou-se que para concentrações de $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ não houve a formação de agregados, em consonância com os experimentos de tensiometria e usando a sonda de pireno. Para as concentrações de $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$, apenas o polímero alquilado apresentou sinal indicativo da presença de agregados, com aproximadamente $440 \pm 20 \text{ nm}$, indicando a possível auto associação do polímero na forma de agregados formados por diversas cadeias.

Silva (2007) conduziu experimentos com o pireno em diferentes solventes e encontrou razões de 1,87 para o pireno em água e valores próximos a 1 em solventes orgânicos. Com base nestes dados fica evidente a formação de ambientes hidrofóbicos pela galactomanana alquilada em concentrações acima da CMC, visto a semelhança no comportamento do pireno em soluções de galactomanana e em solventes orgânicos hidrofóbicos.

Figura 16. Isoterma da razão banda I/III do espectro de fluorescência do pireno em galactomanana Alquilada (Alq3) em função da sua concentração a 25 °C.



FONTE: A autora (2020)

4.4.5 Estabilidade Coloidal

Para as análises de potencial zeta foram escolhidas duas concentrações diferentes, as mesmas concentrações de 0,1 mg.mL⁻¹ e 1,0 mg.mL⁻¹ foram utilizadas a fim de avaliar o efeito da formação de agregados sobre o mesmo. A molécula nativa já apresenta um potencial negativo, provavelmente devido à presença de álcoois primários e secundários na cadeia do polissacarídeo, ou devido à adsorção de íons em solução. Tal potencial tende a cair ainda mais após a oxidação pela conversão de tais álcoois em aldeídos e ácidos carboxílicos, que apresentam carga parcial mais negativa. Como pode ser observado na tabela 6 a concentração não possui efeito sobre o potencial zeta para as amostras nativa, oxidada ou Ox-DDC, indicando que não existe formação de agregado em tais amostras.

Há uma mudança evidente de potencial zeta para a amostra alquilada, acima da CMC. Este efeito pode ocorrer devido ao fato de tanto as unidades de manose quanto as de galactose serem oxidadas, porém apenas as unidades de manose serem parcialmente substituídas na reação de enxertia, conforme indicam os resultados de RMN (item 3.3.2), fazendo com que, no momento da formação dos agregados a cadeia polimérica exponha os grupamentos ácidos presentes das unidades de galactose, reduzindo, assim, seu potencial de superfície. Estes resultados corroboram

para a hipótese de que o polímero em estudo apresenta a capacidade de auto associação e pode, portanto, ser utilizado na produção de nanopartículas.

Tabela 6. Potenciais zeta obtidos para os polímeros nativo, oxidado, alquilado e para a amostra Ox-DDC, em duas concentrações 0,1 e 1,0 mg.mL⁻¹, a temperatura de 25 °C.

Amostra	Concentração (mg/ml)	Potencial (mV)
Nativa	0,1	-27,6±4,5
	1	-24,0±2,1
Oxidada	0,1	-45,3±3,5
	1	-45,4±1,6
Ox-DDC	0,1	-45,3±0,4
	1	-44,5±0,4
Alquilada	0,1	-64,1±0,9
	1	-82,4±1,9

FONTE: A autora (2020)

4.5 CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS OBTIDAS

Após o preparo das formulações descritas anteriormente no item 3.5.2 todas apresentaram coloração alaranjada e turbidez aumentada quando comparadas à dispersão do polímero puro, o que pode caracterizar a formação de partículas. Porém, conforme descrito no mesmo item as formulações 2 e 4 tendiam à precipitação de grandes aglomerados poliméricos, evidenciando a não formação completa de nanopartículas. Quanto à formulação 3 a mesma apresentava-se semelhante a 1 a olho nu, porém pelas análises de DLS foi possível perceber sua inadequabilidade pela ausência de um gráfico de correlação o que indica que não houve formação de partículas.

Subramani e Mehta (2018) definem como nanocápsulas estruturas vazias formadas por uma casca e um espaço em que as substâncias desejadas podem ser inseridas. Como, no presente trabalho, a formação das partículas depende da presença da idebenona as mesmas foram definidas como nanopartículas.

4.5.1 Determinação do tamanho das partículas

As análises de espalhamento de luz dinâmico (DLS) foram realizadas para todas as técnicas de encapsulação descritas no item 3.5.2 (tabela 7), conforme descrito anteriormente as análises de DLS para os dois últimos métodos (E3 e E4), bem como para a técnica de nanoprecipitação não apresentaram correlação confiável e foram descartadas. Pode ser observado que o método escolhido produziu partículas de diâmetro levemente menor, porém, devido à existência de duas populações bem distintas o método continuou a ser otimizado pela sonicação, cujos resultados encontram-se na tabela 7.

Tabela 7. Diâmetros hidrodinâmicos encontrados para os quatro métodos de encapsulamento.

Técnica de Encapsulação	População	Diâmetro Hidrodinâmico (nm)	Número (%)
E1	1	70 ± 26	97
	2	562 ± 3	3
E2	1	194 ± 34	93
	2	504 ± 4	7
E3	-	-	-
E4	-	-	-

FONTE: A autora (2020)

Para o teste de sonicação uma nova amostra foi preparada (0s) e sonicada. Como apresentado na tabela 8 esta nova amostra apresentou um diâmetro

hidrodinâmico levemente maior, portanto os valores obtidos após a sonicação foram comparados a este. Após 30 segundos ocorre o aparecimento de uma nova população ainda menor do que as existentes em quantidade maior em relação às populações maiores, o mesmo ocorre para os próximos tempos de sonicação, porém o aparecimento de uma quarta população ainda maior que as pré-existentes inviabilizou a sonicação por mais de 30 segundos, visto que poderia estar ocorrendo a desestabilização do sistema previamente formado gerando a reorganização das moléculas em partículas maiores. Assim, a amostra escolhida para dar continuidade ao trabalho foi a formulação E1 com 30 segundos de sonicação.

Tabela 8 Diâmetros hidrodinâmicos obtidos após teste de sonicação da amostra E1.

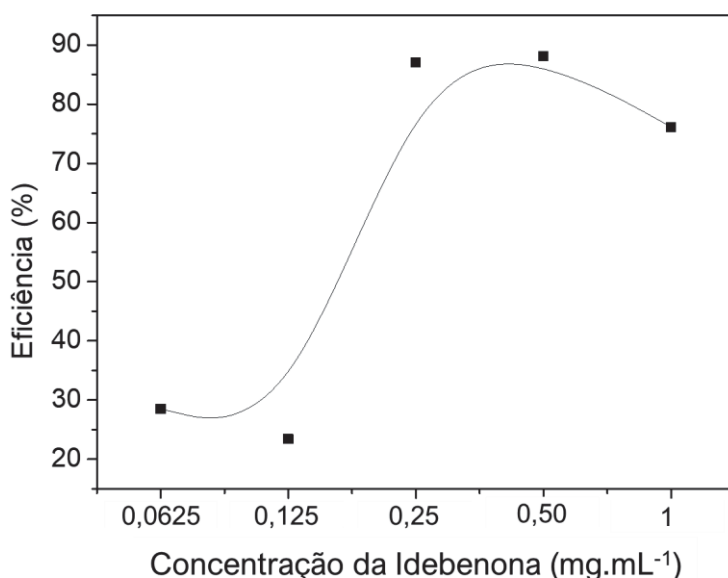
Tempo de sonicação	População	Diâmetro Hidrodinâmico (nm)	Número (%)
0s	1	115 ± 53	99,7
	2	734 ± 40	0,3
30s	1	46 ± 14	99,6
	2	155 ± 83	0,3
	3	420 ± 14	0,03
45s	1	47 ± 29	99,1
	2	123 ± 23	0,3
	3	369 ± 72	0,12
	4	926 ± 192	0,44
60s	1	43 ± 18	78,1
	2	130 ± 31	6,6
	3	424 ± 7	9,9
	4	1204 ± 195	4,4

FONTE: A autora (2020)

4.5.2 Eficiência de encapsulamento

As amostras foram preparadas em proporções fármaco:polímero de 1:1, 0,5:1, 0,25:1, 0,12:1 e 0,06:1. Os valores de eficiência foram, então, calculados com base na solução estoque utilizada no preparo das partículas e plotados na figura 17 em função da concentração de idebenona adicionada à uma concentração fixa de galactomanana alquilada. Como pode ser observado no gráfico, a eficiência sobe até um certo ponto (proporção 0,25:1) onde a quantidade de polímero utilizada é saturada pela idebenona, após este ponto (proporção 0,5:1) a eficiência torna a cair, pois, mesmo que se adicione mais idebenona ao meio, esta não pode mais ser encapsulada. Esta queda poderia, também, ser fruto de um erro analítico, visto o alto limite de quantificação da curva de calibração utilizada. Isto posto a condição escolhida para a análise da cinética de liberação foi na proporção 0,5:1, com 30 segundos de sonicação.

Figura 17. Eficiência de encapsulamento (em %) para formulações preparadas com diferentes concentrações de fármaco utilizando concentração constante de polímero a 1mg.mL^{-1} .



FONTE: A autora (2020)

4.5.3 Cinética de Liberação

Os testes de cinética de liberação iniciaram-se com a escolha do meio. Amorim. *et al.* (2010) utilizou como meio para a liberação da idebenona uma solução aquosa

de Tween 20 a 5% (m/v), visto a baixa solubilidade da idebenona em água que impossibilitaria sua liberação em água pura ou tampão. Este meio foi testado, nas mesmas proporções utilizadas pela autora, porém não ocorreu a solubilização da idebenona, assim nem as partículas nem o fármaco livre apresentaram liberação quando o meio foi analisado por HPLC. Apesar de ter sido utilizado o mesmo meio descrito pela autora, a não solubilização da idebenona pode estar relacionada a diferenças no mecanismo de agitação escolhido, bem como no grau de cristalinidade da idebenona adquirida, visto que podem existir diferenças entre lotes e fabricantes.

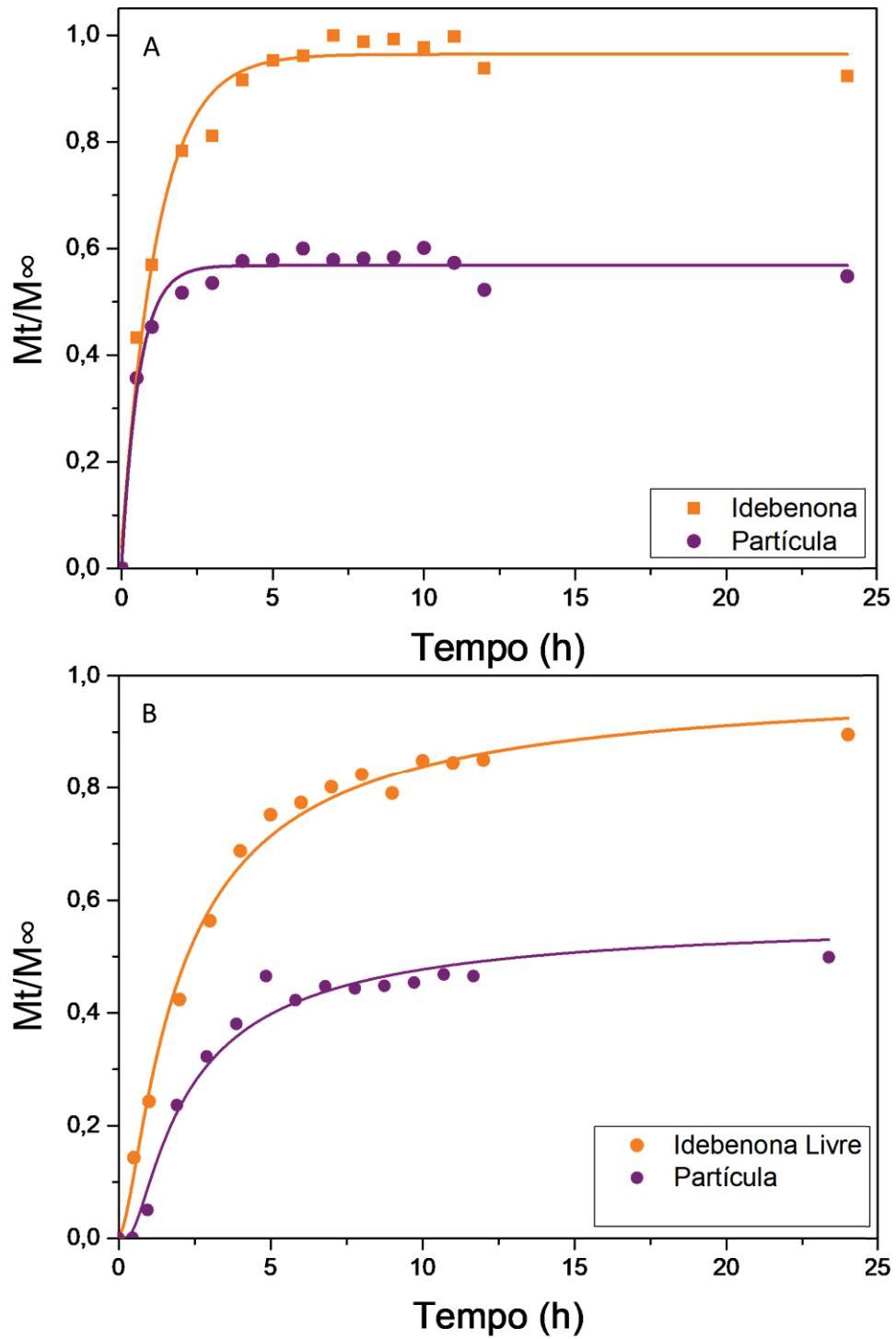
Tentou-se solubilizar a 1 mg de idebenona em 50 mL de uma solução de etanol a 30% (v/v), conforme utilizado por BRENDLE, (2013), porém não houve completa dissolução. Assim, pensou-se em aumentar a proporção de etanol do meio de 30% para 50%(v/v), solução em que a mesma quantidade de idebenona é totalmente solúvel em apenas 5mL. O experimento foi realizado em triplicata com 1,25 mg de idebenona e quantidade de partículas equivalente a 1,25mg de idebenona. Ambas amostras foram acondicionadas em membranas de diálise de éster de celulose com diâmetro de poro de 25 kDa e mantidos imersos em 50 mL de solução aquosa de etanol 50% (v/v). Foram retiradas alíquotas em 30 min, de h em h nas primeiras 12 h e, após, em 24 h. As amostras foram injetadas diretamente no cromatógrafo sem preparo prévio da amostra. Os dados foram plotados em função do tempo dando origem ao gráfico representado na figura 18 (A). Os dados obtidos como % de liberação foram normalizados pela razão da liberação em um tempo t (M_t) e a liberação máxima obtida (M_∞).

Como pode ser observado, apesar de ambos apresentarem cinética de liberação de pseudo-primeira ordem, a cápsula apresenta liberação muito similar a idebenona livre, apresentando uma constante de liberação maior quando comparada à mesma. Com base neste ponto, sugeriu-se que esta condição estava abrindo as partículas e forçando a liberação da completa da idebenona, além da grande quantidade de etanol presente no meio poder interferir no tamanho dos poros da membrana de diálise.

Após este experimento pensou-se em voltar a reduzir a proporção de etanol do meio, porém, como a solução etanólica não possui a capacidade de solubilizar a idebenona por si só, a mesma foi solubilizada previamente. Assim 1,25mg de idebenona foram adicionados ao saco de diálise e acrescidos de 500 μ L de etanol, após a solubilização completa, 2mL de água pura foram adicionados a fim de formar

uma solução em etanol a 20% ao final. O saco de diálise foi, então, fechado e submerso em uma solução de etanol a 20%. Com relação às partículas o procedimento foi similar ao experimento anterior, visto que a adição prévia de etanol às mesmas causaria apenas a sua quebra e geraria novo artefato. A execução do experimento foi similar à anterior e gerou o gráfico representado na figura 18 (B). E nova cinética de liberação apresentou perfil similar ao anterior, porém, contrariando o esperado, as partículas mantiveram um padrão de liberação semelhante à idebenona livre, desta vez, porém, as partículas apresentaram uma liberação menor, sugerindo que as mesmas podem não ter liberado seu conteúdo total no tempo do experimento, liberando apenas a idebenona que estava adsorvida em sua superfície .

Figura 18. Cinética de liberação da idebenona obtida utilizando-se 2,5mg de idebenona em 50mL de solução etanólica 50%(v/v) em água (A) e solução etanólica 30% (v/v) em água (B) como meio a 37 °C

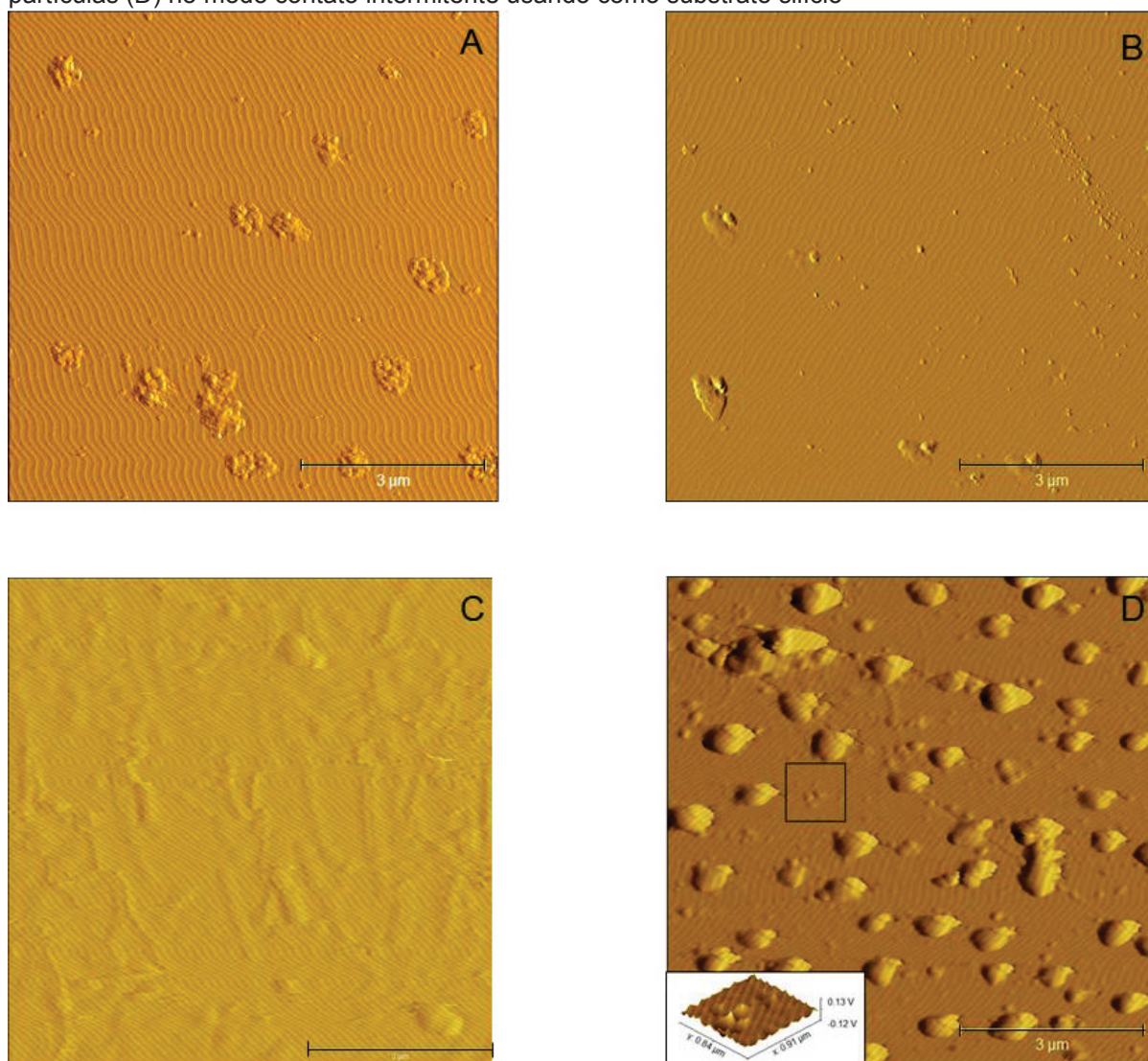


FONTE: A autora (2020)

4.5.4 Microscopia de Força Atômica

As análises de microscopia de força atômica (figura 19) foram realizadas para os polímeros nativo, oxidado e alquilado às concentrações de 1mg.mL^{-1} a fim de buscar a formação de agregados. Para os três polímeros não foram encontrados agregados bem formados, apenas como resultado da deposição do polímero sobre o substrato. Com relação às partículas pode ser observada a presença de duas populações, conforme descrito no item 4.5.1 para as análises de DLS, sendo uma maior em menor número e uma majoritária de diâmetro menor.

Figura 19. Imagens de AFM para os polímeros nativo (A), oxidado (B) e alquilado (C) e para as partículas (D) no modo contato intermitente usando como substrato silício



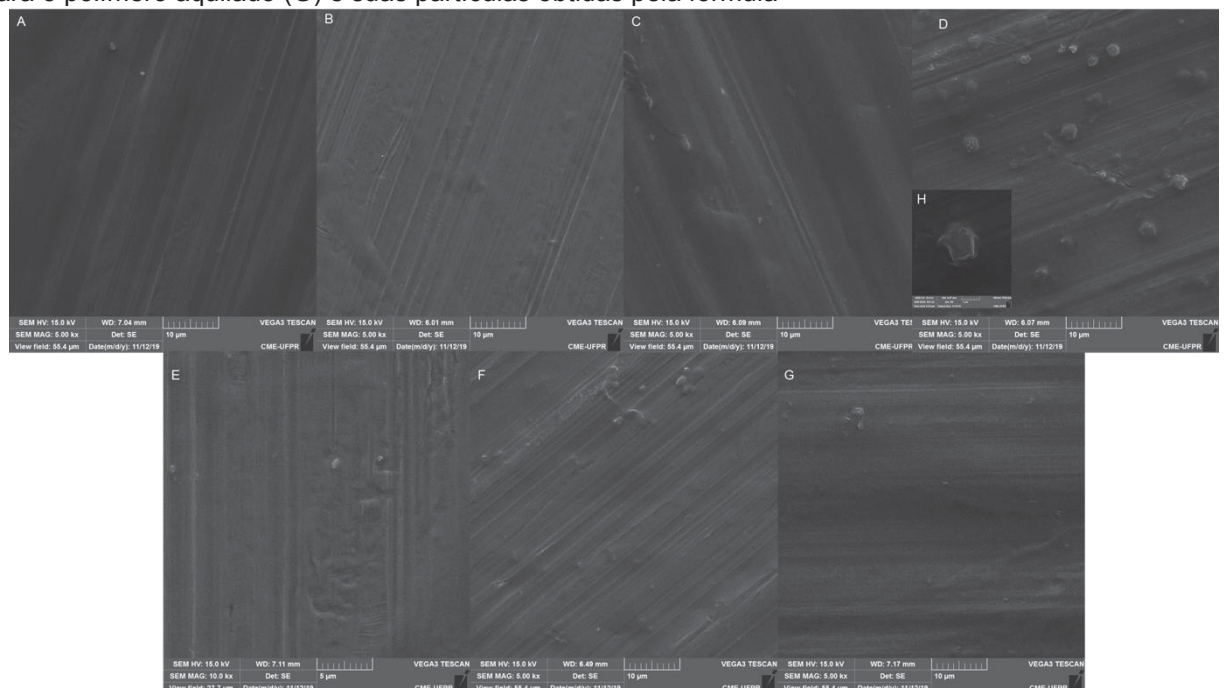
FONTE: A autora (2020)

4.5.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

As análises de microscopia eletrônica de varredura (figura 20) foram realizadas para os polímeros nativo, oxidado e alquilado, além da amostra Ox-DDC. Além dos polímeros livres foram feitas imagens das partículas em estudo e foram preparadas as “partículas” pelo mesmo método de encapsulamento com os polímeros nativo e oxidado, a fim de se avaliar se havia algum potencial auto associativo nos mesmos.

Os polímeros nativo (A), oxidado (E) e alquilado (G) apresentaram tendência à formação de filmes, bem como a amostra Ox-DDC (C). Quanto às formulações contendo idebenona e polímero nativo (B) e oxidado (F) também não existe a tendência à formação de partículas. A única amostra capaz de formar partícula foi a formulação contendo o polímero alquilado com idebenona (D e H). O diâmetro das partículas obtido por DLS para a população majoritária, de aproximadamente 50-100nm, não pode ser observado em função das limitações do MEV.

Figura 20. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica das amostras de goma guar(A) com (B) e sem idebenona, para o polímero oxidado (E) com (F) e sem idebenona, para a amostra ox-DDC (C) e para o polímero alquilado (G) e suas partículas obtidas pela formula

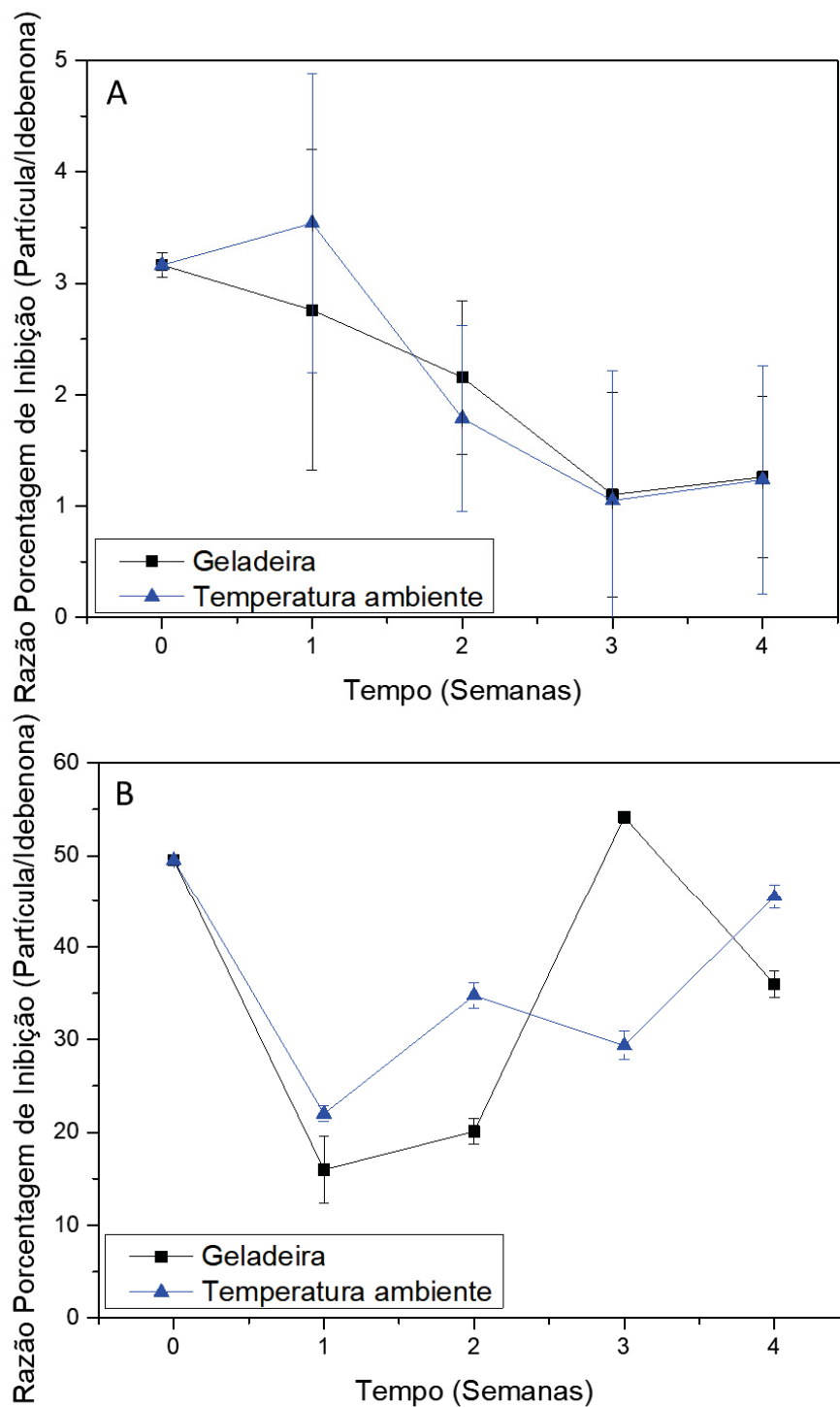


FONTE: A autora (2020)

4.5.6 Estabilidade do Sistema

A estabilidade do sistema foi feita por dois métodos antioxidantes, um em meio etanólico (DPPH) e um em meio aquoso (ABTS), os resultados foram expressos como a razão entre a porcentagem de inibição obtida para a idebenona pela obtida para as partículas. Como pode ser observado no gráfico abaixo (figura 21) a razão tende a decair pela própria degradação da idebenona, porém nunca para valores negativos, indicando que as partículas foram capazes de manter a idebenona estável frente aos dois métodos utilizados, ocorrendo degradação somente da droga adsorvida às partículas. As discrepâncias entre os dois métodos podem ser devido ao próprio meio em que os reagentes são preparados, visto que a idebenona apresenta maior solubilidade em etanol. Os ensaios para o polímero alquilado não indicaram a ocorrência de atividade antioxidante na ausência de idebenona.

Figura 21. Gráficos obtidos da razão das porcentagens de inibição (porcentagem de inibição obtida para as partículas em água/ porcentagem de inibição obtida para a idebenona livre em etanol) para as suspensões acondicionadas em geladeira (8-10 °C) e em temperatura ambiente (15-26 °C) pelo tempo de 4 semanas para os métodos do ABTS (A) e DPPH (B)



FONTE: A autora (2020)

Brendle (2013) realizou estudos de estabilidade em nanopartículas de poli(ϵ -caprolactona) expostas ou não à luz, onde foram avaliados fatores como potencial zeta e tamanho das partículas, sendo que nenhum destes fatores apresentou redução significativa. Porém, quanto ao teor do fármaco, o mesmo diminuiu significativamente após 75 dias de armazenamento para as formulações, indicando que, mesmo protegida em nanopartículas a idebenona tende a degradar. Como pode ser observado na figura 21, também ocorre a diminuição do potencial antioxidante das nanopartículas no decorrer do experimento para o ABTS (fato não observado para o DPPH). Tal perda, demonstrou que em função do tempo a razão das porcentagens de inibição atingiu valores próximos a 1, ou seja, a idebenona encapsulada apresentou atividade igual à idebenona livre com 3-4 semanas de experimento. Entretanto, em nenhuma condição a idebenona livre apresentou porcentagem de inibição superior às nanopartículas (Razão <1).

Foram escolhidos estes dois métodos devido ao meio em que as reações ocorrem, sendo o ABTS preparado em meio aquoso, onde a idebenona livre tem menor solubilidade, podendo ocasionar a precipitação da mesma, porém possibilitando que as partículas se mantenham intactas durante o tempo da reação. Quanto ao método DPPH o mesmo é preparado em etanol, que causa a abertura das partículas, liberando a idebenona de seu interior, porém mantém a idebenona livre em solução durante o tempo do experimento. Isto explica os valores de razão maiores encontrados para o método do DPPH, pois, no mesmo, toda a idebenona incorporada ou adsorvida reagem, devido à abertura das partículas, enquanto para o método do ABTS foram encontrados valores mais baixos, pois não ocorre a completa liberação da idebenona no meio em questão, como pode ser observado pelos gráficos de cinética de liberação.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível desenvolver um sistema auto associado capaz de se auto associar formando domínios hidrofóbicos através da reação de oxidação com TEMPO/NaClO seguida de aminação redutiva. Sistema este em condições de produzir nanopartículas contendo o antioxidante idebenona, não só facilitando sua dispersão em meios aquosos, mas também aumentando sua estabilidade frente a uma solução pura.

Sugere-se a continuidade dos estudos com a galactomanana quanto à sua conformação em diferentes meios, além de análises de potencial irritante da idebenona, a fim de determinar se sua encapsulação foi capaz de reduzir o mesmo. No futuro, talvez possam ser realizados testes do sistema nanoencapsulado como alternativa no tratamento realizado com idebenona por via oral.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, Priscilla B S *et al.* Characterization and rheological study of the galactomannan extracted from seeds of *Cassia grandis*. *Carbohydrate Polymers*, v. 104, p. 127–134, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.01.010>>.

AMORIM, C M *et al.* Stability-indicating LC-PDA method for determination of idebenone in nanoparticles based on chitosan and n-carboxymethylchitosan. *Chromatographia*, v. 70, n. 9–10, p. 1411–1415, 2009. Disponível em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-72949101773&partnerID=40&md5=62e9d1a1d8dcb068d50d727adcf35d3a>>.

AMORIM, Clarissa de M. *et al.* Antioxidant idebenone-loaded nanoparticles based on chitosan and N-carboxymethylchitosan. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v. 6, n. 6, p. 745–752, 2010a.

AMORIM, Clarissa de M. *et al.* Antioxidant idebenone-loaded nanoparticles based on chitosan and N-carboxymethylchitosan. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v. 6, n. 6, p. 745–752, 2010b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2010.06.006>>.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Farmacopeia Brasileira, volume 1. 5ª Ed. Brasília, 2010.

BALDI, Leonardo D. C.; ATVARS, Teresa D. Z. Avaliação da polaridade superficial de náilons por espectroscopia de fluorescência. *Polímeros*, v. 15, n. 1, p. 33–38, 2005.

BARNILS, N *et al.* Response to idebenone and multivitamin therapy in Leber's hereditary optic neuropathy. *Archivos de la Sociedad Espanola de Oftalmologia*, v. 82, n. 6, p. 377–380, 2007.

BRAGD, P. L.; BESEMER, A.C.; BEKKUM, H. V. Bromide-free TEMPO-mediated oxidation of primary alcohol groups in starch and methyl α -D-glucopyranoside. *Carbohydrate Research*, v. 328, p. 355-363, 2000.

BRENDLE, Martina Gehrke. DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE SUSPENSÕES E LIOFILIZADOS DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PARA A VEICULAÇÃO DO NEUROPROTETOR IDEBENONA DISSERTAÇÃO. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA, v. Dissertação, 2013.

CANNAVA, C *et al.* Phase solubility and FTIR-ATR studies of idebenone /

sulfobutyl ether b -cyclodextrin inclusion complex. p. 255–262, 2013.

COLODI, FRANCIELY GROSE COLODI. ULVANAS MODIFICADAS VIA AMIDAÇÃO E AMINAÇÃO REDUTIVA: SEMISSÍNTESE DE HÍBRIDOS ULVANA-KAPPA-CARRABIOSE E ATIVIDADES BIOLÓGICAS. *Dissertação de mestrado, UFPR*, 2017.

COMEX STAT, **Estatísticas de Comércio Exterior**. Disponível em: <<http://comexstat.mdic.gov.br/pt/home>>. Acesso em: 21/05/2020

CRESCENZI, Vittorio *et al.* C (6) -Oxidation Followed by C (5) -Epimerization of Guar Gum Studied by High Field NMR. n. 6, p. 537–546, 2004.

GEORGE, Archana; SHAH, Priyanka A; SHRIVASTAV, Pranav S. Guar gum : Versatile natural polymer for drug delivery applications. *European Polymer Journal*, v. 112, n. October 2018, p. 722–735, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.10.042>>.

ISOGAI, Akira; SAITO, Tsuguyuki; FUKUZUMI, Hayaka. TEMPO-oxidized cellulose nanofibers. *Nanoscale*, v. 3, n. 1, p. 71–85, 2011.

KREUTZER, Bruna. Polymeric Micelles to improve Salinomycin delivery to cancer cells. 2018.

KYADARKUNTE, Abhay Y; PATOLE, Milind S; POKHARKAR, Varsha B. Cellular interactions and photoprotective effects of idebenone-loaded nanostructured lipid carriers stabilized using PEG-free surfactant. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 479, n. 1, p. 77–87, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.044>>.

LI, Bei; GE, Zhi-Qiang. Nanostructured Lipid Carriers Improve Skin Permeation and Chemical Stability of Idebenone. *AAPS PharmSciTech*, v. 13, n. 1, p. 276–283, 2012. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/10.1208/s12249-011-9746-3>>.

LUBAMBO, Adriana F. *et al.* Electrospinning of commercial guar-gum: Effects of purification and filtration. *Carbohydrate Polymers*, v. 93, n. 2, p. 484–491, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.031>>.

MC ALEER, Maeve A.; COLLINS, Paul. Allergic contact dermatitis to hydroxydecyl ubiquinone (idebenone) following application of anti-ageing cosmetic cream. *Contact Dermatitis*, v. 59, n. 3, p. 178–179, 2008.

MCDANIEL, DH *et al.* Clinical efficacy assessment in photodamaged skin of 0.5% and 1.0% idebenone. *Journal of Cosmetic Dermatology*, v. 4, n. 3, p. 167–173,

2005.

MONTENEGRO, Lucia *et al.* Idebenone-loaded solid lipid nanoparticles for drug delivery to the skin: In vitro evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 434, n. 1–2, p. 169–174, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.05.046>>.

MONTENEGRO, Lucia; CASTELLI, Francesco; SARPIETRO, Maria Grazia. Differential scanning calorimetry analyses of idebenone-loaded solid lipid nanoparticles interactions with a model of bio-membrane: A comparison with in vitro skin permeation data. *Pharmaceutics*, v. 11, n. 4, 2018.

OLIVEIRA, Mayara Vianna De. *A AÇÃO DA IDEBENONA DE USO TÓPICO NA PREVENÇÃO DO INTRODUÇÃO O envelhecimento é um processo biológico complexo , caracterizado por alterações bioquímicas , celulares e Nesse processo , a capacidade de homeostase do organismo diminui e causa a morte célula.* 2018. 1–15 f. 2018.

PALUMBO, M. *et al.* Improved antioxidant effect of idebenone-loaded polyethyl-2-cyanoacrylate nanocapsules tested on human fibroblasts. *Pharmaceutical Research*, v. 19, n. 1, p. 71–78, 2002.

REQUETIM, Luis. A utilização em terapêutica de substâncias com atividade nootrópica. *Universidade do Algarve, Faculdades de Ciências e Tecnologia*, p. 75, 2013. Disponível em: <[https://sapientia.ualg.pt/bitstream/10400.1/6885/1/A utilização em terapêutica de substâncias com atividade nootrópica.pdf](https://sapientia.ualg.pt/bitstream/10400.1/6885/1/A%20utiliza%C3%A7%C3%A3o%20em%20terap%C3%Aautica%20de%20subst%C3%A2ncias%20com%20atividade%20nootr%C3%B3pica.pdf)>.

SAKAKIBARA, Caroline Novak; SIERAKOWSKI, Maria Rita; LUCYSZYN, Neoli. TEMPO-mediated oxidation on galactomannan: Gal / Man ratio and chain flexibility dependence. *Carbohydrate Polymers*, v. 153, p. 371–378, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.07.114>>.

SASSEVILLE, Denis; MOREAU, Linda; AL-SOWAIDI, Mowza. Allergic contact dermatitis to idebenone in an over-the-counter anti-ageing cream. *Contact Dermatitis*, v. 58, n. 4, p. 239, 2008.

SEIXAS JUNIOR, Carlos Henrique De. Avaliação da Interação entre Lauril Éter Sulfato de ódio com Goma Guar. *UFPR*, v. Dissertação, p. 1–9, 2019.

SIERAKOWSKI, M. R. *et al.* Specific modifications of galactomannans. *Carbohydrate Polymers*, v. 42, n. 1, p. 51–57, 2000.

SILVA, Renato algusto. Dissertação de Mestrado Aaminação Redutiva de Aldeídos e Cetonas Promovida por Zinco em Meio Aquoso Aaminação Redutiva de

Aldeídos e Cetonas Promovida por Zinco em Meio Aquoso. 2007.

SILVEIRA, Joana Léa Meira; BRESOLIN, Tania Mari Bellé. Pharmaceutical use of galactomannans. *Quimica Nova*, v. 34, n. 2, p. 292–299, 2011.

SIMEPAR. SISTEMA DE TECNOLOGIA E MONITORAMENTO AMBIENTAL DO PARANÁ. . **Boletim Climático**. Disponível em: http://www.simepar.br/prognozweb/simepar/timeline/boletim_climatologico. Acesso em: 02 abr. 2020.

SOUMYA, Rema Sreenivasan; GHOSH, Swapankumar; ABRAHAM, Emilia T. Preparation and characterization of guar gum nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 46, n. 2, p. 267–269, 2010.

SOUZA, Clayton F. *et al.* Oxidation and N-alkylation at the C-6 position of galactomannan extracted from *Caesalpinia ferrea* var. *Ferrea* seeds. *Macromolecular Symposia*, v. 299–300, n. 1, p. 66–73, 2011.

SPIER, Vivian C. *et al.* Polysaccharide depolymerization from TEMPO-catalysis: Effect of TEMPO concentration. *Carbohydrate Polymers*, v. 170, p. 140–147, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.04.064>>.

SUBRAMANI, Karthikeyan; MEHTA, Manjula. *Nanodiagnostics in microbiology and dentistry*. Second Edition ed. [S.I.]: Elsevier Inc., 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-812291-4.00019-4>>.

THAIPONG, Kriengsak *et al.* Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 19, n. 6–7, p. 669–675, 2006.

VALDUGA, AMANDA HARDUIM. IDEBENONA: EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTIOXIDANTE EM CÉLULAS MUSCULARES DISTRÓFICAS DE CAMUNGONDOS MDX. *Dissertação de mestrado*, v. UNIVERSIDA, 2016.

VIEIRA, N. A. B., MOSCARDINI, M. S., TIERA, V. A. O., TIERA, M. J., Aggregation behavior of hydrophobically modified dextran in aqueous solution: a fluorescence probe study. *Carbohydrate Polymers*, 2003, 53, 137-143.

ZIPORI, Dov *et al.* Prevalence of metabolic syndrome in 8 – 18 - year - old school - going children of Srinagar city of Kashmir India. *Indian J Endocrinol Metab.*, v. 2, n. 1, p. 2–11, 2016.